

博士論文

熟成ニンニク抽出液に特徴的な水溶性イオウ化合物類の
体内動態と薬物相互作用に関する研究

平成 29 年 9 月

天野 浩貴

目 次

略語一覧.....	3
構造式一覧.....	4
要約.....	5
総論の部.....	8
緒言.....	8
第 I 章 SAC のラットにおける代謝、排泄、および血中動態.....	11
第 1 節 N-アセチル化、S-酸化、および γ -グルタミル化代謝物の同定.....	12
1-a SAC 投与後の未変化体と代謝物の尿・胆汁中排泄.....	12
1-b SAC 投与後の未変化体と代謝物の血中動態.....	13
第 2 節 代謝経路の推定.....	15
2-a NAc-SAC、SACS、NAc-SACS の投与後の尿・胆汁中排泄.....	16
2-b NAc-SAC、SACS、NAc-SACS の投与後の血中動態.....	17
2-c 肝および腎 S9 画分による <i>in vitro</i> 代謝.....	20
第 3 節 考察.....	24
第 II 章 SAC のイヌにおける代謝、排泄、および血中動態.....	31
第 1 節 N-アセチル化、S-酸化、および γ -グルタミル化代謝物の同定.....	31
1-a SAC 投与後の未変化体と代謝物の尿中排泄と血中動態.....	31
第 2 節 代謝経路の推定.....	34
2-a NAc-SAC、SACS、NAc-SACS の投与後の尿中排泄と血中動態.....	35
2-b 肝および腎 S9 画分による <i>in vitro</i> 代謝と種差.....	38
第 3 節 考察.....	44
第 III 章 SMC と SIPC のラットとイヌにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態.....	49
第 1 節 SMC の N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態.....	49
1-a ラットにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態.....	50
1-b イヌにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態.....	54
1-c 肝および腎 S9 画分による <i>in vitro</i> 代謝と種差.....	56
1-d 考察.....	60
第 2 節 SIPC の N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態.....	63
2-a ラットにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態.....	63
2-b イヌにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態.....	67

2-c 肝および腎 S9 画分による <i>in vitro</i> 代謝と種差	70
2-d 考察	74
第 3 節 SAC、SMC、S1PC のラットとイヌにおける体内動態のまとめ	77
第 IV 章 SAC、SMC、S1PC のヒト CYP 酵素活性に及ぼす影響	82
第 1 節 実験条件の確立	83
1-a プローブ基質の濃度、ヒト肝ミクロソームの蛋白濃度、反応時間の決定	84
1-b 既知阻害剤の IC ₅₀ 値	85
第 2 節 SAC、SMC、S1PC のヒト CYP 酵素活性に及ぼす影響	86
2-a ヒト肝ミクロソームに対する安定性	87
2-b ヒト CYP 酵素反応に対する阻害活性	88
第 3 節 考察	91
結論	94
謝辞	96
実験の部	97
引用文献	104

略語一覽

AGE: aged garlic extract

AUC: area under the plasma concentration versus time curve

C_0 : extrapolated plasma concentration at time zero after intravenous administration

C_{\max} : maximal plasma concentration

CL_{tot} : total body clearance

CL_{int} : intrinsic clearance

CL_r : renal clearance

CYP: cytochrome P450

$f_{u,p}$: unbound fraction in plasma

GFR: glomerular filtration rate

GSAC: γ -glutamyl-*S*-allyl-L-cysteine

HLM: human liver microsomes

LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry

MRT: mean residence time

NADPH: β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form

NAc-SAC: *N*-acetyl-*S*-allyl-L-cysteine

NAc-SACS: *N*-acetyl-*S*-allyl-L-cysteine sulfoxide

NAc-SMC: *N*-acetyl-*S*-methyl-L-cysteine

NAc-SMCS: *N*-acetyl-*S*-methyl-L-cysteine sulfoxide

NAc-SIPC: *trans*-*N*-acetyl-*S*-1-propenyl-L-cysteine

NAc-SIPCS: *trans*-*N*-acetyl-*S*-1-propenyl-L-cysteine sulfoxide

SAC: *S*-allyl-L-cysteine

SACS: *S*-allyl-L-cysteine sulfoxide

SBC: *S*-butenyl-L-cysteine

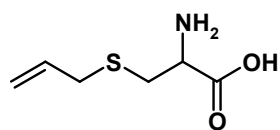
SMC: *S*-methyl-L-cysteine

SIPC: *trans*-*S*-1-propenyl-L-cysteine

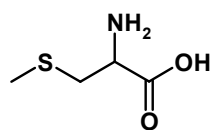
$t_{1/2}$: elimination half-life

$V_{d,ss}$: distribution volume at steady state

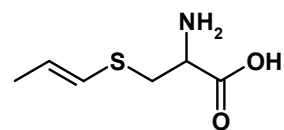
構造式一覧



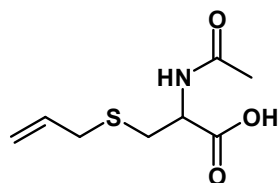
S-Allyl-L-cysteine (SAC)



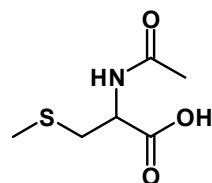
S-Methyl-L-cysteine (SMC)



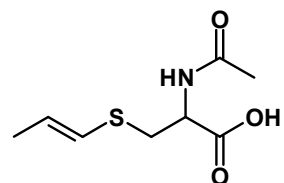
Trans-*S*-1-Propenyl-L-cysteine (S1PC)



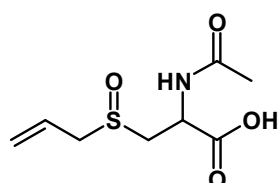
N-Acetyl-*S*-allyl-L-cysteine (NAc-SAC)



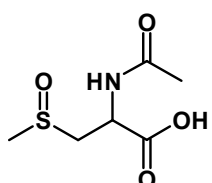
N-Acetyl-*S*-methyl-L-cysteine (NAc-SMC)



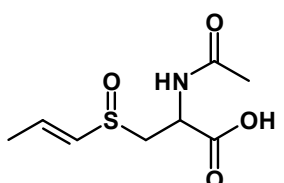
Trans-*N*-Acetyl-*S*-1-propenyl-L-cysteine (NAc-S1PC)



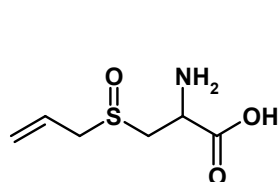
N-Acetyl-*S*-allyl-L-cysteine sulfoxide (NAc-SACS)



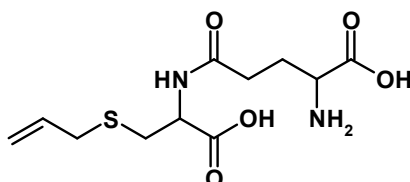
N-Acetyl-*S*-methyl-L-cysteine sulfoxide (NAc-SMCS)



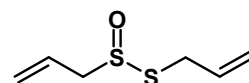
Trans-*N*-Acetyl-*S*-1-propenyl-L-cysteine sulfoxide (NAc-S1PCS)



S-Allyl-L-cysteine sulfoxide (SACS)



γ -Glutamyl-*S*-allyl-L-cysteine (GSAC)



Allicin

要約

熟成ニンニク抽出液 (Aged garlic extract, AGE) は生ニンニクをエタノール中で 10 ヶ月以上にわたって抽出・熟成させ、濃縮した抽出液であり、その様々な有益な薬理作用が臨床試験で明らかとなっている。この熟成過程を経ることによって、生ニンニク中にはほとんど存在しない様々な生理活性成分が生成する。AGE に特徴的な成分として、水溶性イオウ化合物である *S*-allyl-L-cysteine (SAC)、*S*-methyl-L-cysteine (SMC)、および *trans*-*S*-1-propenyl-L-cysteine (S1PC) があり、AGE の薬効を担う重要な成分と考えられている。しかし、これらの水溶性イオウ化合物の体内動態に関する研究は極めて限定的であり、その詳細は不明のままであり、AGE の薬理作用とこれらの成分の体内動態との関係は全く研究されていない。このような背景のもと、SAC、SMC、および S1PC の体内動態を研究し、その動態特性を明らかにすることは、3 成分の薬効と安全性を考える上で必須であり、加えて、得られた研究成果は AGE の薬効を最大限に発揮するための投与形態の最適化や新たな製剤化の検討、あるいは各成分の医薬品化を行う上で、重要な知見になると考える。

本研究は、AGE の主要な薬効成分と考えられている SAC、SMC、および S1PC の体内動態を明らかにすることを目的とし、特に代謝に関しては、代謝物と代謝経路の全容を明らかとし、加えて、代謝臓器を同定することを目指した。実験動物として齧歯類であるラットと非齧歯類であるイヌを選択し、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系で種々の検討を行った。さらに、近年、AGE のような植物療法薬と医療用医薬品の併用に伴う薬物相互作用が懸念されていることから、SAC、SMC、S1PC がヒト cytochrome P450 (CYP) の酵素活性に及ぼす影響を、ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 系で評価した。

第 I 章では、SAC の体内動態に関して、ラットにおける代謝、排泄、および血中動態について検討した。ラットにおける排泄試験と血中動態試験の結果から、SAC の bioavailability は 92% と高く、SAC は N-アセチル化、S-酸化、あるいは γ -グルタミル化を受け、主要代謝物である *N*-acetyl-*S*-allyl-L-cysteine (NAc-SAC) に加えて、*S*-allyl-L-cysteine sulfoxide (SACS)、*N*-acetyl-*S*-allyl-L-cysteine sulfoxide (NAc-SACS)、および γ -glutamyl-*S*-allyl-L-cysteine (GSAC) が血中や尿中に検出された。また、尿中に排泄された SAC とその代謝物の総排泄量は投与量のほぼ 100% を説明できることから、SAC がほぼ完全に吸収されており、他の主要な代謝物は存在しないことも明らかになった。また、SAC の血中濃度はいずれの代謝物の濃度よりも高く推移するものの、未変化体としてはほとんど排泄されず、SAC 投与量の約 85% が NAc-SAC として尿中に排泄されることも示された。さらに、SAC 代謝物の排泄試験と血中動態試験を行った結果、SAC の N-アセチル化に加えて、同時に NAc-SAC の脱アセチル化も起きていること、加えて、SAC から NAc-SACS の生成は NAc-SAC の S-酸化と SACS の N-アセチル化の 2 つの経路を介することが明らかになった。そこで、肝臓と腎臓の S9 画分を用いて SAC の N-アセチル

化活性と NAc-SAC の脱アセチル化活性を比較した結果、ラットの肝臓、腎臓ともに SAC の N-アセチル化活性が脱アセチル化活性に対して優位であり、両臓器において SAC から NAc-SAC が生成しているものと考えられた。さらに、SAC と代謝物の腎クリアランスの値を、それぞれの糸球体ろ過に依存した腎クリアランスの見積もり値と比較した結果、SAC と SACS が腎臓で再吸収されるのに対し、N-アセチル化代謝物である NAc-SAC と NAc-SACS は尿中に能動的に排泄されることが示唆された。以上の検討結果から、SAC は消化管から吸収された後、腎尿細管での再吸収を介して全身を再循環し、最終的には肝臓や腎臓で NAc-SAC や NAc-SACS に代謝された後、尿中に能動的に排泄されるものと考えられた。

第 II 章では、ラットでの研究で得られた知見にもとづき、SAC のイヌでの体内動態を明らかにすることを目的として、ラットの場合と同様に、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。イヌにおいても SAC は bioavailability が 92% と高いこと、N-アセチル化、S-酸化、あるいは γ -グルタミル化を受けること、加えて、NAc-SACS は NAc-SAC の S-酸化と SACS の N-アセチル化の 2 つの経路を介して生成することが確認された。また、SAC はイヌにおいても腎尿細管から再吸収されるために尿中にほとんど排泄されず、SAC の血中濃度は主要代謝物である NAc-SAC や他の代謝物よりも高く推移した。一方で、ラットの場合とは異なり、主要代謝物である NAc-SAC も尿中にほとんど排泄されなかった。そこで、NAc-SAC の腎臓での代謝を調べるために *in vitro* 代謝試験を行った結果、イヌの肝臓は SAC の N-アセチル化活性と NAc-SAC の脱アセチル化活性がほぼ同等であるのに対し、腎臓では NAc-SAC の脱アセチル化活性が N-アセチル化に比べて約 80 倍高いことが示された。以上の検討結果から、イヌとラットにおける SAC の体内動態は類似することが明らかとなった。しかし、イヌにおいては主要代謝物である NAc-SAC は腎排泄過程でそのほとんどが SAC へ代謝され、糸球体ろ過された SAC と一緒に再吸収を介して全身を再循環していると考えられ、このことが SAC の血中濃度が極めて持続(消失半減期、12 h)することに寄与していると考えられた。加えて、SAC と代謝物の総尿中排泄量は投与量の約 15% しか説明できないことから、SAC や NAc-SAC が最終的には胆汁へ排泄されている可能性、あるいは未知の代謝物へ代謝されている可能性が考えられた。

第 III 章では、SAC の研究で得られた知見をもとに、SMC と SIPC の代謝、排泄、および血中動態を明らかにすることを目的として、SAC の場合と同様に、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。代謝については、SAC の主要な消失経路が NAc-SAC への代謝であったことから、特に N-アセチル化代謝に焦点を当てて研究を行った。SIPC と SAC の構造はイオウ原子の置換基が 1-プロペニル基と 2-プロペニル基の違いだけであり、極めて類似している。SIPC のラットとイヌにおける排泄試験と血中動態試験、および *in vitro* 代謝試験を行った結果、SAC の体内動態について上述したことが SIPC においても観察され、SIPC と SAC の体内動態は極めて類似することが明らかになった。一方、

SMC については、SAC や SIPC と同様に、ラットとイヌにおいて、bioavailability に優れること(>95%)、および腎尿細管で再吸収されることが示された。しかし、SMC の静脈内投与後の血中に出現する *N*-acetyl-*S*-methyl-L-cysteine (NAc-SMC)の濃度は SMC 濃度と比べて極めて低く、SMC の area under the plasma concentration versus time curve (AUC)に対する NAc-SMC の AUC の割合は、ラットにおいては約 1.5%、イヌにおいては約 1.3%に過ぎず、SMC は *N*-アセチル化代謝を受け難いことが明らかになった。そこで、*in vitro* 代謝試験を行った結果、ラットやイヌの肝臓には SMC の *N*-アセチル化活性が検出されず、腎臓の NAc-SMC の脱アセチル化活性は SMC の *N*-アセチル化活性に比べて、ラットでは約 9 倍、イヌでは約 160 倍も高いことが示され、*in vivo* において SMC が *N*-アセチル化代謝を受け難いという結果が裏付けられた。

第 IV 章では、SAC、SMC、SIPC のヒト CYP の主要な 5 つのアイソフォーム(CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4)の酵素活性に及ぼす影響を *in vitro* 系で評価した。3 化合物がヒト肝ミクロソームとの反応において安定であることを確認した後、ヒト肝ミクロソームにおける各 CYP アイソフォームに特異的な代謝反応に及ぼす影響を評価した。CYP1A2 による反応では phenacetin から acetaminophen の生成を、CYP2C9 による反応では diclofenac から 4'-hydroxydiclofenac の生成を、CYP2C19 による反応では *S*-mephenytoin から 4'-hydroxymephenytoin の生成を、CYP2D6 による反応では dextromethorphan から dextrorphan の生成を、CYP3A による反応では midazolam、testosterone から 1'-hydroxymidazolam、6β-hydroxytestosterone の生成を、それぞれ測定した。その結果、SAC、SMC、SIPC はいずれも、各 CYP アイソフォームの代謝反応にはほとんど影響を与えず(IC₅₀ 値>1 mM)、3 化合物が CYP 阻害に基づく薬物相互作用を引き起こす可能性は極めて低いと結論した。

以上、AGE の薬効成分と考えられる主要 3 成分のラットとイヌにおける体内動態は、優れた経口吸収性と腎臓での再吸収によって特徴付けられ、SAC と SIPC の体内動態は極めて類似していることが明らかになった。加えて、3 化合物の体内動態には腎臓が重要な役割を果たし、その代謝(*N*-アセチル化と脱アセチル化の優位性)と排泄(分泌と再吸収の寄与)を介して 3 化合物の血中濃度の持続に大きく影響を及ぼすことが示された。得られた成果は、今後、これら 3 成分についてのヒトにおける体内動態研究実施に向けて重要な基礎的知見となると考える。また、3 成分のヒト CYP 酵素活性に与える影響は、AGE 服用時に想定される血中濃度下では、ほとんど無視できる程度であることが示されたことから、臨床試験において、CYP 阻害に関する薬物相互作用の有無を調べる必要はないと考える。さらに、本研究において用いた手法と得られた成果は他の水溶性イオウ化合物の体内動態研究へも応用可能であり、水溶性イオウ化合物の体内動態の全容解明に寄与するものと考ええる。

総論の部

緒言

ニンニクは、健康促進あるいは疾病予防のための食物として幅広く認識されており、様々な病気を治療するための伝承薬として用いられてきた¹⁻⁴⁾。日本では滋養強壮作用を有する生薬として認識されてきたが、近年はコレステロール低下作用や血小板凝集抑制作用など、心臓血管系への効果が注目を集めている。また、米国国立癌研究所によるデザイナーズフードプログラムでは、ニンニクは癌予防効果が期待できる最上位の食品群に含まれ、ニンニク抽出液やニンニク関連イオウ化合物の腫瘍細胞に対する増殖抑制効果、移植癌に対する抗腫瘍効果、あるいは発がん予防効果が数多く報告されている⁵⁻⁷⁾。

ニンニク製品は生ニンニクの調整・加工法により幾つかのクラスに大別でき、生ニンニクを乾燥後に粉末化するガーリック粉末、生ニンニクを水蒸気蒸留するガーリックオイル、生ニンニク破砕物の植物オイル抽出物、あるいは生ニンニクを長期間抽出・熟成する AGE 等、様々なタイプの製品が存在する。この中で、AGE は生ニンニクを水性アルコール中で長期間抽出・熟成して得られるユニークな素材であり、血清脂質低下⁸⁾、血圧低下⁹⁾、動脈硬化進展抑制¹⁰⁾、あるいは免疫賦活¹¹⁾など、AGE の有益な薬理作用が臨床試験において実証されている。また、AGE には他の製品には存在しない多様な成分が含まれ、その熟成・抽出過程において、生ニンニク中に含まれる臭気性化合物や刺激性の化合物が修飾され、あるいは消失し、新たに AGE に特徴的な水溶性イオウ化合物が生成する¹²⁾。AGE の代表的な水溶性イオウ化合物の一つに SAC がある。SAC は生ニンニク中には前駆物質である GSAC として存在し、AGE の熟成過程において、酵素反応(脱グルタミル化)によって生成する。また、AGE 中には cysteine-S-conjugate であり、SAC の類似化合物である SMC や S1PC が含まれる(Fig. 1)。なお、市販の AGE 含有製剤の 1 日服用量(以下、AGE1 日服用量)に含まれる SAC、SMC、および S1PC の量はそれぞれ、1~2 mg、0.1~0.2 mg、および 0.6~1.2 mg である。



Fig. 1 Chemical structures of SAC, SMC, and S1PC

これら3つの水溶性イオウ化合物の中で、SACはAGEの薬理作用を担う主要な生物活性成分の一つと考えられており、各種動物モデルにおける抗腫瘍効果¹³⁾、心保護作用¹⁴⁾、あるいは腎保護作用¹⁵⁾など、その多様な薬理作用が報告されている。一方、S1PCはその化学構造やAGE中含量の点でSACと非常に類似しており、SACと同様に、熟成期間中に前駆体であるγ-グルタミル化合物から生成

すると考えられている。S1PC はシス・トランス間の異性化が起こり易いためその調製が難しく、その生物活性に関する知見はほとんど得られていないが、最近、S1PC が免疫機能調整作用を有することが報告されている¹⁶⁾。また、SMC についても、その癌予防効果¹⁷⁾、抗糖尿病効果¹⁸⁾、あるいはパーキンソン様疾患に対する予防効果¹⁹⁾が報告されており、SAC に加えて S1PC や SMC も AGE の生物活性成分と考えられている。

水溶性イオウ化合物である SAC、SMC、および S1PC が AGE の生物活性成分として、その薬理作用を発揮するには、AGE 摂取後にそれぞれの成分が速やかに経口吸収され、標的臓器へと運ばれる必要がある。また、活性代謝物が存在し、薬理作用の一端を担う可能性も否定できない。しかし、SAC、SMC、および S1PC の体内動態に関する研究は限定的であり、SAC や SMC について僅かの研究が行われているのみである。

これまでに、マウス、ラット、およびイヌにおける SAC の体内動態が研究されており、SAC はいずれの動物種においても優れた経口吸収性を有し^{20,21)}、ラットにおいては、N-アセチル化を受けた NAc-SAC、S-酸化を受けた SACS、および N-アセチル化と S-酸化をともに受けた NAc-SACS (Fig. 2) が尿中代謝物として検出されている²²⁾。

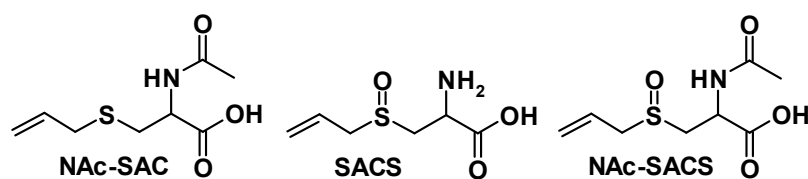


Fig. 2 Chemical structures of NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS

しかし、Krause ら²²⁾の報告では、SAC をラットに腹腔内投与した後、尿中へ排泄された未変化体と代謝物 (NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS) の合計は投与量の約 50% に過ぎず、残りの 50% の行方については明らかにされていない。また、いずれの研究においても、SAC 代謝物の血中濃度は測定されておらず、SAC と代謝物の血中濃度の大小関係を含め、代謝物の体内動態に関する知見は得られていない。従って、SAC に関しては、その優れた経口吸収性が報告され、ラットにおいては幾つかの尿中代謝物が同定されているが、代謝物の全容とその代謝経路は不明のままであり、代謝臓器も明らかにされていない。また、S1PC と SAC の構造は非常に類似していることから、両化合物の体内動態の比較に興味をもたれるが、S1PC の体内動態に関する研究報告は未だない。さらに、ラットとヒトにおいて SMC の尿中代謝物が探索されており、N-アセチル化や S-酸化、あるいは脱アミノ化を受けた代謝物が検出されているが²³⁻²⁵⁾、SMC やその代謝物の血中動態を調べた研究報告はない。

以上のように、AGE の主要な水溶性イオウ化合物である SAC、SMC、および S1PC の体内動態に関

しては、SACの経口吸収性が調べられ、SACとSMCの尿中代謝物が探索されているだけであり、その詳細については明らかになっていない。そこで、本研究は3つの水溶性イオウ化合物(SAC、SMC、SIPC)の体内動態、特に代謝(代謝物の全容と代謝経路の解明、および代謝臓器の同定と代謝の種差)を明らかにすることを目的に、種々の検討を行った。まず、SACの排泄試験と血中動態試験をラットとイヌを用いて実施し、その体内動態特性と排泄様式を明らかにした。また、代謝経路を解明するために、SAC代謝物の排泄試験と血中動態試験も併せて実施した。さらには、N-アセチル化代謝を担う代謝臓器と代謝の種差を明らかにする目的で、肝臓と腎臓のS9画分を用いた*in vitro*代謝試験を行った。さらに、SACで得られた知見をもとに、SMCとSIPCについてもSACと同様の研究を行い、SAC、SMC、およびSIPCの間の体内動態を比較した。最後に、薬物相互作用に関する知見を得るために、SAC、SMC、およびSIPCのヒトCYP酵素活性に及ぼす影響をヒト肝ミクロソームとプローブ基質を用いた*in vitro*評価系を用いて調べた。

本研究で用いた研究手法は他のcysteine-S-conjugateの体内動態研究に応用可能なものである。また、本研究で得られた結果は、3化合物のヒト体内動態研究を計画・実施する上で必要な情報であり、加えて、今後、3化合物の体内動態に基づいた適切な試験計画のもとに薬理試験が実施され、薬理作用と体内動態の関係が明らかにされることが期待される。

以下、4章にわたり得られた知見を論述する。

第I章 SACのラットにおける代謝、排泄、および血中動態

これまでに、SACのラットにおける体内動態に関して、3つの研究結果が報告されている。Nagaeら²⁰⁾は、SACはラットにおいて優れた経口吸収性を有し、そのbioavailabilityは98%であることを報告している。しかし、この値は50 mg/kgの投与量で得られた結果であり、実際にヒトでの服用量と比較して著しく高い用量設定となっている。また、12.5、25、および50 mg/kgでのbioavailabilityはそれぞれ、64%、77%、および98%であり、低用量では初回通過効果を受けることが示唆されている。一方、Yanら²¹⁾の研究では、ラットへの25~100 mg/kgの経口投与におけるbioavailabilityは91~97%であることが示され、初回通過効果を受けるという結果は得られていない。ただし、Nagaeら²⁰⁾とYanら²¹⁾の研究はいずれもSACの血中濃度のみを分析しており、代謝物に関する検討は行っていない。さらに、Krauseら²²⁾はラット体内でSACがSACSへ代謝されることを確認するために、SACの200および400 mg/kgを腹腔内投与したラットの24時間尿を分析した結果、SACは尿中へほとんど排泄されず(投与量の1%以下)、投与量の31~40%、7~9%、および1%以下がそれぞれ、NAc-SAC、NAc-SACS、およびSACSとして排泄されることを報告している。

以上の知見にもとづき、SACの代謝、排泄、および血中動態の全容を明らかにする目的で、ラットにおける体内動態研究を行うことにした。研究を開始するにあたり、動物実験での投与量を低く設定するために、分析方法の検討を行った。Nagaeら²⁰⁾はSACの測定にはプレカラム蛍光誘導体化法を用い、NAc-SACの測定ではNAc-SACを酵素処理によってSACに変換し、酵素処理前後でのSAC量の差をNAc-SAC量とした。一方、Krauseら²²⁾は、プレカラム蛍光誘導体化法を用いてSACとSACSを測定し、NAc-SACは誘導体化した後にガスクロマトグラフィーで測定した。また、NAc-SACSはNAc-SACに変換した後、ガスクロマトグラフィーで測定している。Nagaeら²⁰⁾とKrauseら²²⁾の研究では化合物分析における検出限界値や定量下限値が示されていないが、その測定感度に応じて12.5~400 mg/kgという高い投与量が設定されたと考えられる。本研究ではSACとその代謝物を選択的、かつ高感度で測定するためにliquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)法を採用し、5 mg/kgという低用量での試験が可能となった。5 mg/kgという投与量は、ヒトにおけるAGE1日服用量に含まれるSAC量から換算した投与量(ヒト体重を70 kgとした)に比べると、依然として175~350倍高いが、生成量の少ない代謝物を精度良く分析するために本投与量を採用した。

第1節 N-アセチル化、S-酸化、およびγ-グルタミル化代謝物の同定

本節ではSACの代謝物の全容を明らかにすることを目指した。Krauseら²²⁾はSACをラットへ腹腔内投与した後、尿中に排泄された未変化体とN-アセチル化やS-酸化を受けた代謝物(NAc-SAC、SACS、NAc-SACS)の合計は投与量の約50%であることを報告している。この結果から、SACには未知の代謝物が存在する可能性、あるいはSACとその代謝物が胆汁中へ排泄された可能性が示された。そこで、SAC投与後の未変化体と代謝物(NAc-SAC、SACS、NAc-SACS)の尿・胆汁中排泄と血中動態の解析・評価を行った。なお、尿・胆汁中排泄と血中動態の試験は別々に実施した。

1-a SAC投与後の未変化体と代謝物の尿・胆汁中排泄

SACの5 mg/kgをラットに経口、あるいは静脈内投与した後、尿と胆汁を24時間採取し、尿・胆汁中に排泄されたSAC、NAc-SAC、SACS、およびNAc-SACSをLC-MS/MSにて測定した。尚、尿は無処理ラットから、胆汁は胆管にカニキュレーションを施したラットから、別々に採取した。

Table 1 には、経口あるいは静脈内投与後のSACとその代謝物であるNAc-SAC、SACS、NAc-SACSの尿・胆汁中排泄率(%、投与量に対する割合)を示す。

まず、SACとその代謝物(NAc-SAC、SACS、NAc-SACS)は胆汁中へほとんど排泄されなかった。Krauseら²²⁾の研究において、SACの代謝物が胆汁中に排泄される可能性が示されていたが、実際にはほとんど排泄されなかった。

SACは未変化体としてはほとんど排泄されず、尿および胆汁中には投与量の1%程度がそれぞれ排泄された。SAC投与量の大部分はN-アセチル化代謝物であるNAc-SACとNAc-SACSとして尿中へ排泄され、静脈内投与後、SAC、NAc-SAC、SACS、およびNAc-SACSの尿中排泄率はそれぞれ、投与量の0.95%、84%、0.01%、および11%であった。経口投与後においても、SACと代謝物ともに静脈内投与後とほぼ同等の排泄率が得られた。なお、SACSの尿中濃度は、静脈内投与ではSACを投与されたラットの3匹中2匹において、経口投与では3匹中1匹において検出限界以下であったため、それらの個体の排泄率をゼロとして、平均値を算出した。また、SACと代謝物(NAc-SAC、SACS、NAc-SACS)の尿中排泄量の合計はSAC投与量の96%(静脈内投与)と96%(経口投与)であることから、SACはほぼ完全に経口吸収されており、他の主要な代謝物は存在しないことが示された。

Table 1 Urinary and biliary excretion of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS in rats after oral and i.v. administration of SAC^a.

Excreta		Excretion (% of dose) ^b				
		SAC	NAc-SAC	SACS	NAc-SACS	Total
Urine	i.v.	0.95 ± 0.14	84 ± 3.9	0.01 ± 0.01	11 ± 0.09	96 ± 3.8
	oral	1.6 ± 0.92	83 ± 6.7	0.03 ± 0.03	11 ± 2.1	96 ± 6.4
Bile	i.v.	0.51 ± 0.09	0.92 ± 0.47	n.d.	0.06 ± 0.04	1.5 ± 0.59
	oral	0.45 ± 0.28	0.77 ± 0.58	n.d.	0.05 ± 0.03	1.3 ± 0.89

Data represent mean ± S.D. of three rats. n.d., not detected.

^aA single oral or i.v. dose (5 mg/kg) of SAC was administered to intact and bile duct-cannulated rats.

^bAmount (% of dose, on a molar basis) of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS excreted in urine and bile for 24 h postdose.

1-b SAC 投与後の未変化体と代謝物の血中動態

上記 1-a の排泄試験において、SAC の静脈内投与後に尿・胆汁中に排泄された SAC と代謝物 (NAc-SAC、SACS、NAc-SACS) の合計量が投与量のほぼ 100%に近いことが示され、他の主要な代謝物は存在しないことが明らかとなった。本項では、SAC 投与後の未変化体と代謝物の血中動態を明らかにすることを目的に検討を行った。

SAC の 5 mg/kg をラットに経口、あるいは静脈内投与した後、血液を経時的に採取し、SAC、NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、および GSAC の血漿中濃度を LC-MS/MS にて測定した。

Fig. 3 には、SAC 投与後の未変化体(SAC)と代謝物(NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、GSAC)の血漿中濃度推移を示す。SAC は未変化体としてはほとんど排泄されなかったが、その血漿中濃度はいずれの代謝物よりも高い濃度で推移した。代謝物の濃度は NAc-SAC>>NAc-SACS>SACS≒GSAC の順に高く推移し、SAC と主要代謝物 NAc-SAC の濃度は平衡を保ちながら減少した。また、尿・胆汁中にはほとんど排泄されなかった SACS の濃度は NAc-SACS の濃度と同程度に推移した。さらに、低濃度であるが、尿・胆汁中には全く排泄されなかった GSAC が血漿中に検出された。

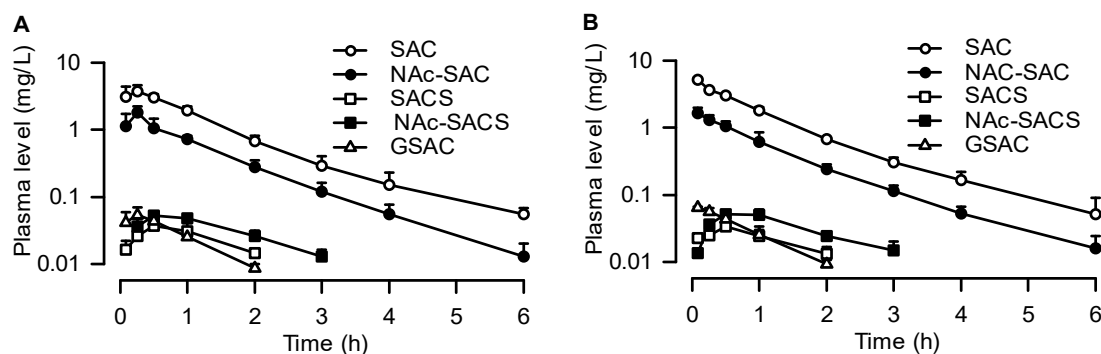


Fig. 3 Plasma concentration-time profiles in rats after administration of a single dose (5 mg/kg) of SAC (A, oral; B, i.v.). Each point represents mean ± S.D. of three to four rats.

Table 2 には、SAC の主要な体内動態パラメータを示す。尚、体内動態パラメータはモデル非依存的解析法であるモーメント解析により算出した。SAC は経口吸収性に優れ、その bioavailability は 92.1% であった。また、elimination half-life ($t_{1/2}$)、total body clearance (CL_{tot})、renal clearance (CL_r)、および distribution volume at steady state (Vd_{ss}) はそれぞれ、1.1~1.2 h、0.91 h/kg、0.0086 L/h/kg、および 1.0 L/kg であった。

SAC の CL_r は CL_{tot} の約 0.9% に過ぎず、SAC の血漿中からの消失のほとんどが代謝に依存していることが改めて示された。また、平衡透析法により測定した SAC の血漿中の unbound fraction in plasma (f_{up} , 0.79) と ラットの glomerular filtration rate (GFR) の報告値 (約 0.3 L/h/kg²⁶⁾) をもとに SAC の糸球体ろ過に依存した腎クリアランスを算出 ($GFR \times f_{up}$) したところ、0.24 L/h/kg (約 0.3 L/h/kg²⁶ \times 0.79) という値が得られた。このことから、SAC の CL_r (0.0086 L/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランスの約 3.6% であることが示され、SAC は腎臓で糸球体ろ過された後、その大部分は腎尿細管で再吸収されることが示唆された。

さらに、SAC の代謝物 (NAc-SAC、SACS、NAc-SACS) についても同様に、SAC 投与後に得られた尿中排泄率 (Table 1) と AUC の値 (Table 2) を用いて、それぞれの CL_r を算出した (Table 2)。SACS については、尿中排泄率の測定精度に問題があると考えられるが、算出された SACS の CL_r は SAC の値と同程度に小さい値 (0.0067 L/h/kg) であった。一方、NAc-SAC と NAc-SACS の CL_r は非常に大きな値 (2.9 L/h/kg と 5.7 L/h/kg) となり、SAC、SACS と NAc-SAC、NAc-SACS の腎排泄様式は異なる可能性が示された。そこで、SAC の代謝物についても平衡透析法にて f_{up} (NAc-SAC 0.47, SACS 0.84, NAc-SACS 0.71) を測定し、糸球体ろ過に依存した腎クリアランスを見積もることにした。その結果、SACS の CL_r (0.0067 L/h/kg) は、糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (約 0.3 L/h/kg²⁶) \times 0.84 = 0.25 L/h/kg の約 2.6% となり、SAC と同様に SACS は腎尿細管から再吸収されることが示唆された。一方、N-アセチル化代謝物である NAc-SAC と NAc-SACS の CL_r (2.9 L/h/kg と 5.7 L/h/kg) は、それぞれの糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (0.14 L/h/kg と 0.21 L/h/kg) よりも 20~30 倍大きい値となり、SAC や SACS とは逆に尿中へ能動的に分泌されている可能性が示された。しかし、この N-アセチル化代謝物の腎排泄については仮に N-アセチル化代謝物が腎臓内で生成し、そのまま尿中に排泄されるとすると CL_r の過大評価につながるので、注意深い考察が必要となる。このことについては、N-アセチル化代謝物投与後の動態を検討することで明らかになると考えられる。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of SAC in rats after oral and i.v. administration^a.

Parameters	i.v.	oral
C ₀ or C _{max} (mg/L)	6.2 ± 0.56	3.9 ± 0.64
t _{max} (h)	-	0.27 ± 0.17
t _{1/2} (h) at terminal	1.1 ± 0.27	1.2 ± 0.19
CL _{tot} (L/h/kg)	0.91 ± 0.035	-
CL _r (L/h/kg)	0.0086	0.016
f _{up} ^b		0.79
GFR ^c × f _{up} ^b (L/h/kg)		0.24
MRT (h)	1.14 ± 0.081	1.24 ± 0.015
Vd _{ss} (L/kg)	1.0 ± 0.072	-
Bioavailability (%)	-	92.1
AUC (mg·h/L)	5.50 ± 0.21	5.07 ± 0.58
MRT (h) of metabolites		
NAc-SAC	1.24 ± 0.15	-
SACS	n.c.	-
NAc-SACS	n.c.	-
GSAC	n.c.	-
AUC (mg·h/L) of metabolites		
NAc-SAC	1.80 ± 0.19	1.96 ± 0.39
SACS	0.068 ± 0.016	0.072 ± 0.015
NAc-SACS	0.13 ± 0.028	0.12 ± 0.014
GSAC	0.069 ± 0.011	0.066 ± 0.006
CL _r (L/h/kg) of metabolites		
NAc-SAC	2.9	2.7
SACS	0.0067	0.021
NAc-SACS	5.7	6.4
GSAC	n.c.	n.c.

Data represent mean ± S.D. of four rats. n.c., not calculated.

^aA single oral or i.v. dose (5 mg/kg) of SAC was administered to rats. ^bf_{up} was determined *in vitro* by using an equilibrium dialysis device. ^cGFR, 0.3 L/h/kg²⁶⁾.

第2節 代謝経路の推定

第1節において、SAC投与後の血中に尿中代謝物であるNAc-SAC、SACS、NAc-SACSに加えて、GSAC が出現することを明らかにした。これらの代謝物のうち、NAc-SAC、SACS、および GSAC はそれぞれ、SAC の N-アセチル化、S-酸化、および γ-グルタミル化によって生成する。一方、NAc-SACS はNAc-SAC の S-酸化とSACS の N-アセチル化の両経路で生成することが可能である。

第2節ではSACの代謝経路を明らかにすることを目的に、NAc-SAC、SACS、あるいはNAc-SACSをラットに投与し、それらの尿・胆汁中排泄と血中動態の解析・評価を行った。尚、尿・胆汁中排泄と血中動態の試験は別々に実施した。さらに、SACのN-アセチル化代謝を担う臓器とその代謝活性を明らかにする目的で、ラットの肝臓と腎臓のS9画分を用いた*in vitro*代謝試験を行った。

2-a NAc-SAC、SACS、NAc-SACS の投与後の尿・胆汁中排泄

NAc-SAC、SACS、あるいは NAc-SACS の 5 mg/kg をラットに静脈内投与した後、尿と胆汁を 24 時間採取し、尿・胆汁中に排泄された SAC、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS を LC-MS/MS にて測定した。尿は無処置ラットから、胆汁は胆管にカニュレーションを施したラットから、別々に採取した。

Table 3 には、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS の投与後の尿・胆汁中排泄率(%、投与量に対する割合)を示す。尚、比較のために、SAC 投与後のデータを併せて示している。

まず、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS のいずれの SAC 代謝物も胆汁中にはほとんど排泄されなかった。NAc-SAC の静脈内投与後に尿中に排泄された SAC、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS の量はそれぞれ、投与量の 1.8%、84%、0.02%、および 12%であり、各化合物の尿中排泄率は SAC 投与後に得られた値と同程度であった。なお、SACS の尿中濃度は、NAc-SAC を投与されたラットの 3 匹中 2 匹で検出限界以下であったため、それらの個体の排泄率をゼロとして、平均値を算出した。また、NAc-SAC の投与後に SAC と NAc-SACS が尿中に排泄されたことから、NAc-SAC は脱アセチル化と S-酸化を受けることが示唆された。一方、SACS は未変化体としてはほとんど排泄されず、主に NAc-SACS として尿中に排泄された。SACS 投与後の SACS と NAc-SACS の尿中排泄率はそれぞれ、0.1%と 85%であり、SAC を投与した場合と同様に、SACS の投与量の大部分は N-アセチル化代謝物として、尿中に排泄されることが明らかとなった。また、NAc-SACS の投与後、投与量の 96%が未変化体として尿中に排泄されたことから、NAc-SACS は NAc-SAC や SACS とは異なり、代謝的に安定であることが示された。

Table 3 Urinary and biliary excretion of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS in rats after i.v. administration.

Compound ^a	Excreta	Excretion (% of dose) ^b				
		SAC	NAc-SAC	SACS	NAc-SACS	Total
SAC	urine	0.95 ± 0.14	84 ± 3.9	0.01 ± 0.01	11 ± 0.09	96 ± 3.8
	bile	0.51 ± 0.09	0.92 ± 0.47	n.d.	0.06 ± 0.04	1.5 ± 0.59
NAc-SAC	urine	1.8 ± 0.53	84 ± 0.91	0.02 ± 0.03	12 ± 2.1	98 ± 3.1
	bile	0.49 ± 0.14	0.72 ± 0.21	n.d.	0.08 ± 0.04	1.3 ± 0.34
SACS	urine	n.d.	n.d.	0.10 ± 0.01	85 ± 4.6	85 ± 4.6
	bile	n.d.	n.d.	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.06	0.32 ± 0.07
NAc-SACS	urine	n.d.	n.d.	n.d.	96 ± 2.2	96 ± 2.2
	bile	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-

Data represent mean ± S.D. of three rats. n.d., not detected. n.e., not examined.

^aA single i.v. dose (5 mg/kg) of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS was administered to intact and bile duct-cannulated rats.

^bAmount (% of dose, on a molar basis) of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS excreted in urine and bile for 24 h postdose.

2-b NAc-SAC、SACS、NAc-SACS の投与後の血中動態

NAc-SAC、SACS、あるいはNAc-SACSの5 mg/kgをラットに静脈内投与した後、血液を経時的に採取し、SAC、NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、およびGSACの血漿中濃度をLC-MS/MSにて測定した。

Fig. 4A には、NAc-SAC の投与後、血漿中に出現した SAC、NAc-SAC、NAc-SACS、および GSAC の濃度推移を示す。NAc-SAC を投与されたラットの尿中に SAC が排泄された結果 (Table 3) と整合して、NAc-SAC の投与後に SAC が血漿中に検出された。この結果から、ラットにおいては SAC の N-アセチル化に加えて、同時に NAc-SAC の脱アセチル化も起きていることが示された。従って、SAC から NAc-SAC 生成の速度と程度は N-アセチル化酵素と脱アセチル化酵素の組織分布性とその酵素活性に依存すると考えられる。また、NAc-SAC の投与後、NAc-SACS が血漿中に出現したことから、SAC から NAc-SACS の生成は NAc-SAC の S-酸化を経由する可能性が示された。一方で、NAc-SAC 投与後の SACS の血漿中濃度は定量限界値以下 (0.01 mg/L 以下) であったことから、NAc-SAC の脱アセチル化によって生成した SAC が、S-酸化とそれに続く N-アセチル化を介して NAc-SACS へ代謝された可能性は低いと考えられた。

Fig. 4B には、SACS の投与後、血漿中に出現した SACS と NAc-SACS の濃度推移を示す。SACS 投与量の 85% が NAc-SACS として尿中へ排泄された結果 (Table 3) と整合して、SACS の投与後、その濃度は急激に減少し、それに応じて NAc-SACS が血漿中に出現した。SACS を投与したラットの尿中 (Table 3) や血漿中には NAc-SAC が検出されなかったことから、SAC から NAc-SACS の生成は少なくとも SACS の N-アセチル化を経由することが示された。さらに、NAc-SACS 投与後の尿中に SACS が排泄されない結果 (Table 3) と整合して、NAc-SACS 投与後の血中に SACS が検出されず (Fig. 4C)、ラットにおいては SACS の N-アセチル化は進むが、NAc-SACS の脱アセチル化は起こらないことが確認された。

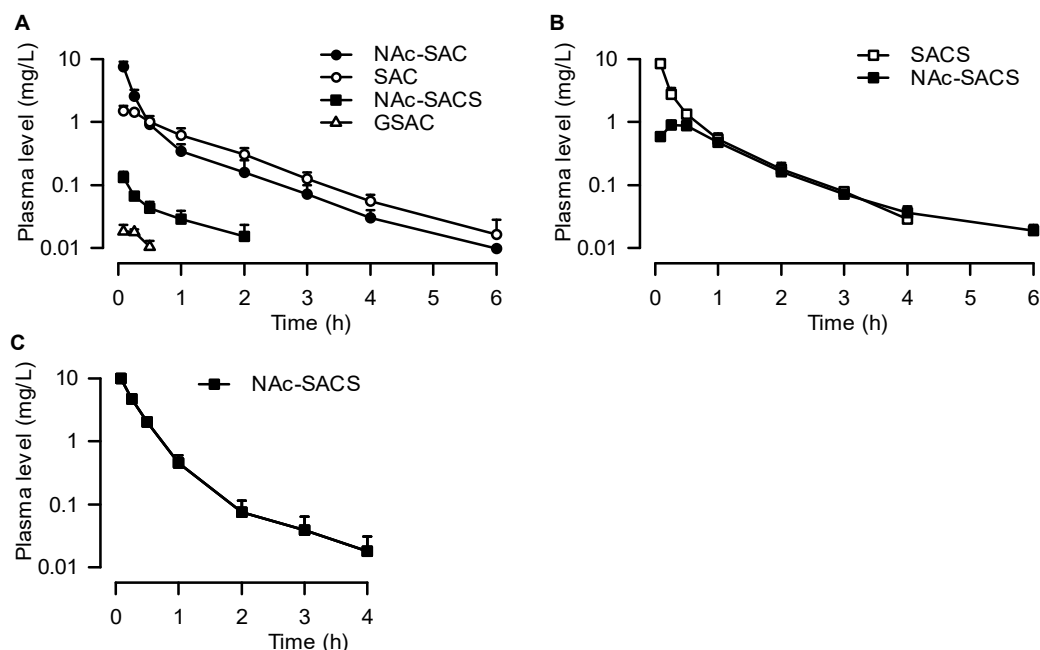


Fig. 4 Plasma concentration-time profiles in rats after administration of a single i.v. dose (5 mg/kg) of NAc-SAC (A), SACS (B), and NAc-SACS (C). Each point represents mean \pm S.D. of three to four rats.

Table 4 には、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS の主要な体内動態パラメータを示す。尚、比較のために、SAC の体内動態パラメータを併せて示している。まず、SAC と代謝物 (NAc-SAC、SACS、NAc-SACS) の $V_{d_{ss}}$ は $0.45\sim 1.0$ L/kg であった。各化合物の油水分配係数は測定していないが、いずれの化合物も水溶性が高く、血漿蛋白ともある程度、結合することから (f_{up} は $0.47\sim 0.84$)、組織への移行性は低く、その $V_{d_{ss}}$ はラットの全水分量 (0.67 L/kg²⁶) と同定度の値になったと思われる。

上記 1-b で示されていたように、SAC の代謝物の CL_r には大きな差が認められ、代謝物の種類によって腎排泄様式が異なることが確認された。SAC と同様に、S-酸化代謝物である SACS の CL_r (0.0014 L/h/kg) は、 CL_{tot} (1.5 L/h/kg) に比して著しく小さい上、糸球体ろ過に依存した腎クリアランス ($GFR \times f_{up} = 0.25$ L/h/kg) の値をも大きく下回っていることが示された。排泄試験での結果と併せると、SACS の血漿からの消失は主に NAc-SACS への代謝に依存しており、腎排泄の過程においては腎尿細管で再吸収を受けることが示唆された。一方、NAc-SAC と NAc-SACS の CL_r (1.5 L/h/kg と 1.2 L/h/kg) は、それぞれの CL_{tot} の値に近く、両代謝物の主要な消失経路が腎排泄であることが確認できた。また、同時に NAc-SAC と NAc-SACS の CL_r は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (NAc-SAC 0.14 L/h/kg、NAc-SACS 0.21 L/h/kg) と比べて非常に大きな値であり、SAC や SACS とは逆に尿中へ能動的に分泌されていることが改めて示唆された。しかし、一方で、ここで得られた NAc-SAC と NAc-SACS の CL_r (1.5 L/h/kg と 1.2 L/h/kg) はそれぞれ、SAC と SACS の投与後に得られた NAc-SAC と NAc-SACS の CL_r (2.9 L/h/kg と 4.1 L/h/kg) と比較すると明らかに小さい値であった。また、

NAc-SACS の CL_r については、NAc-SAC の投与後に得られた NAc-SACS の CL_r (4.9 L/h/kg) が NAc-SACS の投与後に得られた値 (1.2 L/h/kg) よりも大きな値を与えた。親化合物を投与した場合と代謝物自身を投与した場合に得られる代謝物の CL_r が異なる理由については、考察の項で論述する。

Table 4 Pharmacokinetic parameters of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS in rats after i.v. administration.

Parameters	Dosed compounds			
	SAC ^a	NAc-SAC ^a	SACS ^a	NAc-SACS ^a
C_0 (mg/L)	6.2 ± 0.56	13 ± 2.7	15 ± 1.8	14 ± 1.7
CL_{tot} (L/h/kg)	0.91 ± 0.035	1.8 ± 0.34	1.5 ± 0.13	1.3 ± 0.19
$t_{1/2}$ (h) at terminal	1.1 ± 0.27	1.0 ± 0.25	0.99 ± 0.13	0.84 ± 0.41
CL_r (L/h/kg)	0.0086	1.5	0.0014	1.2
f_{up}^b	0.79	0.47	0.84	0.71
$GFR^c \times f_{up}^b$ (L/h/kg)	0.24	0.14	0.25	0.21
MRT (h)	1.14 ± 0.081	0.52 ± 0.054	0.52 ± 0.015	0.37 ± 0.082
Vd_{ss} (L/kg)	1.0 ± 0.072	0.94 ± 0.21	0.75 ± 0.056	0.45 ± 0.028
AUC (mg·h/L)	5.50 ± 0.21	2.89 ± 0.66	3.47 ± 0.32	4.05 ± 0.64
MRT (h) of metabolites				
SAC	-	1.25 ± 0.10	-	-
NAc-SAC	1.24 ± 0.15	-	-	-
SACS	n.c.	n.c.	-	-
NAc-SACS	n.c.	n.c.	1.3 ± 0.077	-
GSAC	n.c.	n.c.	-	-
AUC (mg·h/L) of				
SAC	-	1.87 ± 0.33	n.d.	n.d.
NAc-SAC	1.80 ± 0.19	-	n.d.	n.d.
SACS	0.068 ± 0.016	<0.06	-	n.d.
NAc-SACS	0.13 ± 0.028	0.13 ± 0.075	1.28 ± 0.085	-
GSAC	0.069 ± 0.011	0.010 ± 0.001	n.d.	n.d.
CL_r (L/h/kg) of metabolites				
SAC	-	0.038	-	-
NAc-SAC	2.9	-	-	-
SACS	0.0067	-	-	-
NAc-SACS	5.7	4.9	4.1	-

Data represent mean ± S.D. of three to four rats. n.d., not detected. n.c., not calculated.

^aA single i.v. dose (5 mg/kg) of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS was administered to rats.

^b f_{up} was determined *in vitro* by using an equilibrium dialysis device. ^cGFR, 0.3 L/h/kg²⁶⁾.

2-c 肝および腎 S9 画分による *in vitro* 代謝

SAC とその代謝物 (NAc-SAC、SACS、NAc-SACS) の体内動態試験を行い、ラットにおいて SAC と SACS が N-アセチル化を受けること、NAc-SAC が脱アセチル化を受けること、一方で NAc-SACS は脱アセチル化を受けないことが示された。そこで、N-アセチル化と脱アセチル化の代謝臓器を明らかにし、両代謝活性の比較を行う目的で、ラットの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験を行い、それぞれの代謝固有クリアランス (intrinsic clearance, CL_{int}) を算出した。

一般的に、 CL_{int} は異なる複数の基質濃度における代謝速度を測定し、適切な解析を行って求められるミカエリス定数 (K_m) と最大代謝速度 (V_{max}) をもとに算出される ($CL_{int} = V_{max}/K_m$)。しかし、本研究の主な目的は、肝臓と腎臓における N-アセチル化と脱アセチル化の代謝活性の確認と両活性の比較であることから、一つの基質濃度で得られる代謝速度から CL_{int} を算出する簡便な方法を用いた。この方法では K_m と V_{max} の個々の値は求められず、算出される CL_{int} は V_{max}/K_m ではなく $V_{max}/(K_m + S)$ (S は基質濃度) である。しかし、 K_m に対して相対的に小さい S を用いた場合は V_{max}/K_m に近似できることから、汎用される方法である。医薬品の K_m は数 μM ~数十 μM であること、および S9 画分の代謝活性が低い場合を考慮して、代謝試験における基質濃度を 5 μM に設定した。

S9 画分による N-アセチル化反応と脱アセチル化反応の CL_{int} 算出には異なる反応系を用いた。S9 画分による NAc-SAC と NAc-SACS の脱アセチル化試験においては、反応液に Acetyl-CoA を添加しないために逆向きの N-アセチル化反応は起こらず、脱アセチル化反応のみが進行する。一方向性の酵素反応の場合には、基質の代謝速度はミカエリス・メンテンの式に従い、式 1) のように表される。 K_m に対して十分に小さい S を用いた場合は式 2) に近似され、式 3) が導かれる。式 3) は残存する基質濃度の自然対数値を反応時間に対してプロットすると、 $slope$ が $(V_{max}/K_m) \times P$ の直線が得られることを意味し、 $slope$ を P で除することで $CL_{int} (= V_{max}/K_m)$ が算出できる (式 4)。従って、NAc-SAC と NAc-SACS の脱アセチル化試験においては、種々の反応時間における NAc-SAC と NAc-SACS の残存濃度、あるいは SAC と SACS の生成濃度をそれぞれ測定し、残存濃度の自然対数値-反応時間プロットを線形最小二乗法によって解析し、得られた $slope$ から CL_{int} ($CL_{int, deacetylation}$) を算出した。尚、予備検討により、脱アセチル化以外の代謝が起こらないことを確認した。

$$dS/dt/P = -\frac{V_{\max}}{K_m + S} \times S \dots \text{式1)}$$

$$K_m > S, dS/dt/P = -\frac{V_{\max}}{K_m} \times S \dots \text{式2)}$$

$$\text{LN } St = \text{LN } S_0 - \frac{V_{\max}}{K_m} \times P \times t \dots \text{式3)}$$

$$\frac{V_{\max}}{K_m} = -\frac{\text{slope}}{P} \dots \text{式4)}$$

ここで、 S と P はそれぞれ、反応溶液中の基質濃度とS9画分の蛋白濃度を、 t は反応時間を、 S_0 と S_t はそれぞれ、反応時間ゼロと t における基質の残存濃度を示している。

Fig. 5 には、ラットの肝臓と腎臓の S9 画分による NAc-SAC の脱アセチル化反応において、脱アセチル化されずに残存する NAc-SAC 濃度の自然対数値を反応時間に対してプロットした。図に示すように、決定係数の高い直線が得られ、NAc-SAC の脱アセチル化反応の $CL_{\text{int,deacetylation}}$ は $5.9 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein(肝 S9 画分)と $27 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein(腎 S9 画分)と算出された。一方、肝臓と腎臓の S9 画分には NAc-SACS の脱アセチル化活性が検出されなかった。

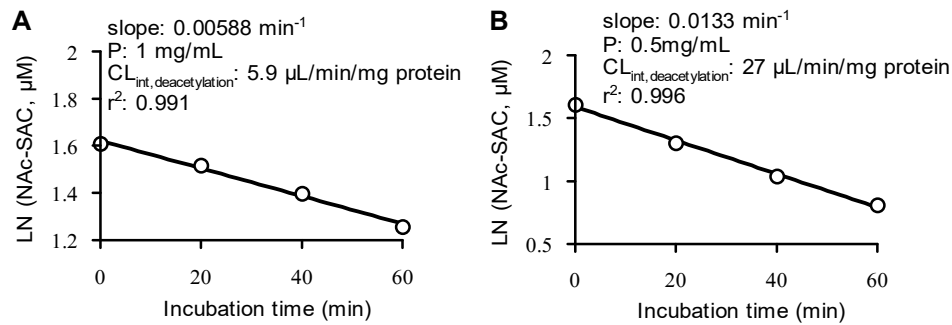


Fig. 5 Concentration of NAc-SAC remained-time plots in the incubation mixtures for NAc-SAC deacetylation by rat liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

SAC と SACS の N-アセチル化試験においては、反応液にアセチル基供与体である Acetyl-CoA を添加した。この反応液中では N-アセチル化と脱アセチル化の両反応が進行し、両反応の反応速度が平衡に達するまで N-アセチル化代謝物の生成が反応時間に対して上に凸の曲線を描くように進むと考えられる。この場合、N-アセチル化代謝物の生成速度は式 5)で表され、反応時間 t における代謝物の生成濃度を表す式 6)が導かれる。そこで、種々の反応時間における N-アセチル化代謝物の生成濃度を測定し、N-アセチル化代謝物濃度-反応時間プロットを非線形最小二乗法によって解析し、 A/a と a を求めた。ここで、 A/a と a の値からN-アセチル化の $CL_{\text{int,acetylation}}$ と脱アセチル化の $CL_{\text{int,deacetylation}}$ の両値が算出可能となるが、 $CL_{\text{int,deacetylation}}$ については上述した脱アセチル化試験からも算出される。本方法のように N-アセチル化と脱アセチル化の両反応が進行し、2 つの当てはめパラメータ(A/a と a)から求め

る $CL_{int, deacetylation}$ は、脱アセチル化反応のみが進行する試験系で求める $CL_{int, deacetylation}$ と比べて、精度の点で劣ると考えられる。そこで、 $CL_{int, deacetylation}$ は脱アセチル化試験で得られた値を採用することとした。その場合には、 $CL_{int, acetylation}$ は a と A/a の値を用いて、別々に算出できる。ここで、 a は N-アセチル化代謝物の生成濃度が頭打ちになるまでの反応時間と N-アセチル化代謝物濃度-反応時間プロットの曲線の形を決定するパラメータであるのに対して、 A/a は N-アセチル化と脱アセチル化の代謝速度が平衡に達したときの、N-アセチル化代謝物の濃度を表すパラメータである。N-アセチル化試験での反応時間を、N-アセチル化代謝物の生成が頭打ちになるまで十分に長く設定することで、精度の高い A/a 値が得られると考え、式 7) に示すように、 A/a の値と脱アセチル化試験で得られた $CL_{int, deacetylation}$ の値を用いて $CL_{int, acetylation}$ を算出した。

$$dC/dt/P = S \times CL_{int, acetylation} - C \times CL_{int, deacetylation}, S_0 = S + C \dots \text{式5)}$$

$$C_t = A/a \times (1 - \exp^{-at}) \dots \text{式6)}$$

$$a = P \times (CL_{int, acetylation} + CL_{int, deacetylation}), A/a = S_0 \times \frac{CL_{int, acetylation}}{CL_{int, acetylation} + CL_{int, deacetylation}}$$

$$CL_{int, acetylation} = A/a \times \frac{CL_{int, deacetylation}}{(S_0 - A/a)} \dots \text{式7)}$$

ここで、 P は反応液中の S9 画分の蛋白濃度を、 S と C はそれぞれ、基質濃度と N-アセチル化代謝物の濃度を、 S_0 と C_t はそれぞれ、基質の初期濃度と N-アセチル化代謝物の反応時間 t における濃度を、 $CL_{int, acetylation}$ と $CL_{int, deacetylation}$ はそれぞれ、N-アセチル化反応と脱アセチル化反応の CL_{int} を示している。

Fig. 6 には、ラットの肝臓と腎臓の S9 画分による SAC の N-アセチル化反応において、NAc-SAC の生成濃度を反応時間に対してプロットした。図に示すように、決定係数の高い当てはめ曲線が得られ、SAC の N-アセチル化反応の $CL_{int, acetylation}$ は $30 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (肝 S9 画分) と $190 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (腎 S9 画分) と算出された。

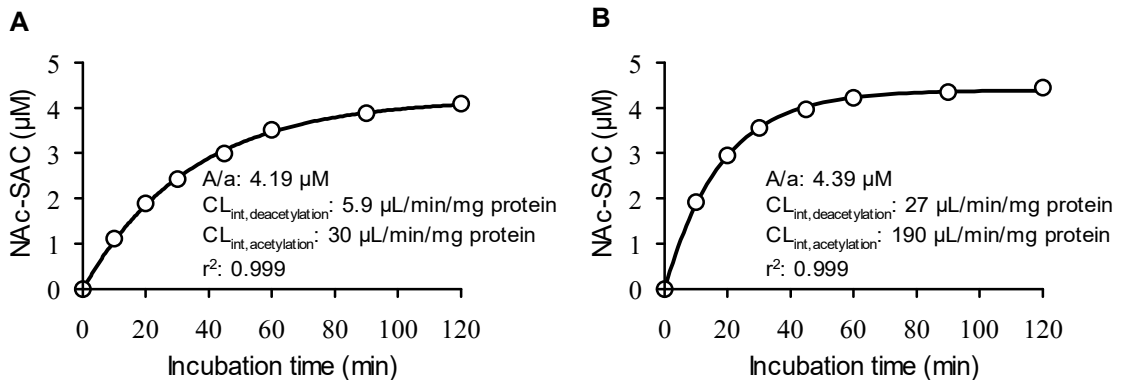


Fig. 6 Concentration of NAc-SAC formed-time plots in the incubation mixtures for SAC N-acetylation by rat liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

一方、SACS の N-アセチル化試験を行うにあたっては、前述したように肝臓と腎臓の S9 画分には NAc-SACS の脱アセチル化活性がないことに加えて、他の代謝反応が起こらないことが確認された。従って、N-アセチル化の一方向の反応のみを観察できることから、SACS の $CL_{int,acetylation}$ は、脱アセチル化試験の場合と同様に式 4)を用いて算出した。SACS の残存濃度の自然対数値を反応時間に対してプロットし、得られた解析結果から、SACS の N-アセチル化反応の $CL_{int,acetylation}$ は $0.55 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein(肝 S9 画分)と $13 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein(腎 S9 画分)と算出された (Fig. 7A と 7B)。

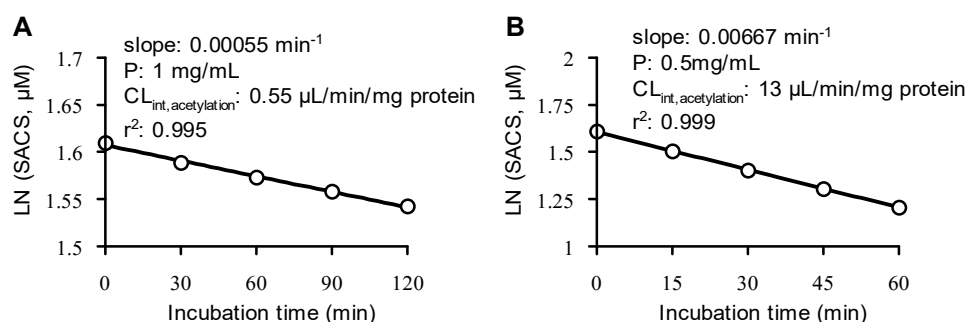


Fig. 7 Concentration of SACS remaind-time plots in the incubation mixtures for SACS N-acetylation by rat liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

結果のまとめを Table 5 に示す。なお、 CL_{int} は S9 蛋白量当たりの値に加えて、体重 kg 当たりの値も併せて算出した。ラットの肝臓と腎臓はいずれも、SAC の N-アセチル化活性と NAc-SAC の脱アセチル化活性を有し、SAC の N-アセチル化活性は NAc-SAC の脱アセチル化活性よりも 5~7 倍高いことが示された。また、N-アセチル化と脱アセチル化の体重 kg 当たりの活性には、肝臓と腎臓の間でほとんど差がないことから、SAC から NAc-SAC の生成には肝臓と腎臓が同程度に寄与するものと考えられた。一方、SACS の N-アセチル化と NAc-SACS の脱アセチル化については、肝臓、腎臓いずれにおいても、SACS の N-アセチル化活性のみが検出され、NAc-SACS の脱アセチル化活性は検出されなかった。

Table 5 CL_{int} values for *N*-acetylation of SAC and SACS and for deacetylation of NAc-SAC and NAc-SACS by rat liver and kidney S9 fractions.

S9	<i>N</i> -acetylation of		Deacetylation of	
	SAC	SACS	NAc-SAC	NAc-SACS
$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein				
Liver	30	0.55	5.9	n.d.
Kidney	190	13	27	n.d.
$\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$ body weight				
Liver ^{a)}	148	2.7	28	n.d.
Kidney ^{b)}	142	10	20	n.d.

^{a)}40 g liver/kg body weight²⁶⁾, 121 mg S9 protein/g liver²⁷⁾. ^{b)}8.0 g kidney/kg body weight²⁶⁾, 93.5 mg S9 protein/g kidney²⁷⁾. n.d., not detected.

第3節 考察

これまでに、マウス、ラット、およびイヌにおいて SAC の体内動態が調べられ、いずれの動物種においても SAC の経口吸収性は優れていることが報告されている^{20,21)}。しかし、各動物試験で用いられた SAC の投与量(12.5~100 mg/kg)は著しく高く、SAC の吸収や排泄の過程において飽和が生じている可能性は否定できない。実際に、Nagae ら²⁰⁾の研究ではラットでの bioavailability が投与量に依存して増加し、SAC が初回通過効果を受けており、それが飽和している可能性が示されている。また、SAC の尿中代謝物が探索され、ラットの尿中に N-アセチル化や S-酸化を受けた代謝物が排泄されることが報告されている。Krause ら²²⁾は SAC を腹腔内投与したラットの尿中に、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS が排泄されることを定量的に明らかにしたが、尿中に排泄された SAC とその尿中代謝物の合計は投与量の 40~50%に過ぎず、残りの 50~60%については不明であった。

本章では、これまでの研究で用いられた投与量(12.5~100 mg/kg)よりも低い 5 mg/kg という用量において、SAC のラットでの体内動態、および代謝物の全容とその代謝経路を明らかにすることを目的として、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。

静脈内投与後と経口投与後、いずれも、SAC は未変化体としてはほとんど排泄されず、主に N-アセチル化代謝物である NAc-SAC や NAc-SACS として尿中に排泄された。両投与経路における未変化体(SAC)と代謝物(NAc-SAC、SACS、NAc-SACS)の尿中排泄量の合計は投与量の 96%であり(Table 1)、投与量のほぼ全てを説明できることが明らかとなった。このことは、同時に、SAC の経口吸収性が極めて良好であり、ほぼ完全に吸収されていることをも示した。一方で、本研究で得られた結果は、SAC と代謝物(NAc-SAC、SACS、NAc-SACS)の総尿中排泄率が 40~50%であったとする Krause ら²²⁾の研究結果とは異なるものであった。本研究では SAC の低用量(5 mg/kg)を経口および静脈内投与したのに対し、Krause ら²²⁾は高用量(200 と 400 mg/kg)を腹腔内投与している。腹腔内投与においてもほ

ば完全な吸収が期待されることから、両研究間での SAC と代謝物の総尿中排泄率の違いは吸収以外の要因に因るものと考えられる。Tateishi²⁸⁾はラット肝臓には cysteine-S-conjugate の C-S 結合の開裂酵素が存在し、SAC と構造に近い S-propyl-L-cysteine も本酵素の基質となることを報告している。しかし、最も代謝され易い基質でさえも、その K_m 値は sub-mM~mM であると報告されていることから、SAC が C-S 結合開裂反応を受けると仮定した場合においても、その肝臓中濃度が sub-mM レベルにならないと実際に代謝反応は進行しないと考えられる。そこで、経口投与と静脈内投与での MRT の差から求められる吸収速度定数 (K_a , 0.16 min^{-1})、投与量 (Dose, 5 mg/kg)、経口吸収される割合 (F , 経口吸収率を 100%とした)、および肝血流量 (Q_H , 55 mL/min/kg ²⁶⁾) を $K_a \times \text{Dose} \times F/Q_H$ の式に当てはめ²⁹⁾、肝臓入口の(考えられる)最高濃度を算出すると、 0.091 mM という値が得られた。この計算から、本研究においては、SAC 投与後の肝臓中濃度は sub-mM には達せず、そのような代謝反応はほとんど進行しなかったと考えられる。一方、Krause ら²²⁾の研究では、本研究と比べて 40~80 倍の高用量が腹腔内投与されたために、SAC の肝臓中濃度は数 mM レベルに達したと推測される。この場合には、SAC は N-アセチル化や S-酸化に加えて、C-S 結合の開裂も受けることになり、その結果、本研究と比べて SAC 代謝物 (NAc-SAC、SACS、NAc-SACS) の総尿中排泄率が低くなった可能性が考えられた。

本研究において、SAC の 5 mg/kg 経口投与時の bioavailability は 92.1%と算出された (Table 2)。この結果は、SAC の 12.5、25、および 50 mg/kg の経口投与において、投与量の増加に伴って初回通過効果が飽和し、その bioavailability が 64%から 98%へ増加するという Nagae ら²⁰⁾の結果とは異なるものであった。その一方で、Lee ら³⁰⁾らは、1、12.5、および 25 mg/kg の経口投与において、SAC の AUC が投与量に比例して増加することを報告している。本研究における尿中排泄試験の結果から、SAC はほぼ完全に吸収されていると考えられ、その一方で、*in vitro* 代謝実験の結果から、肝臓で SAC が NAc-SAC へと代謝されていることは明らかである。しかし、同時に逆向きの NAc-SAC の脱アセチル化も進行していると考えられることから、結果として、高い bioavailability が得られたものと推測された。

SAC とその代謝物の血中動態試験では、SAC と代謝物の血漿中濃度を測定した。SAC を投与されたラットの血漿中には、尿中代謝物である NAc-SAC、SACS、NAc-SACS に加えて、GSAC も検出された (Fig. 3A と Fig. 3B)。また、SAC は主に N-アセチル化代謝物 (NAc-SAC と NAc-SACS) として尿中に排泄されたが (Table 1)、SAC の血漿中濃度は NAc-SAC や NAc-SACS よりも高い濃度で推移した。この結果は SAC と N-アセチル化代謝物の腎排泄様式が異なることを示唆したため、さらに腎クリアランスの解析を行った。その結果、SAC の CL_r (0.0086 L/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス ($GFR \times f_{up}$, 0.24 L/h/kg) の約 3.6%と顕著に小さいことが示され、SAC は糸球体ろ過された後に腎尿細管から再吸収されているものと考えられた (Table 2)。同様のことが SACS にも見られ、SACS の CL_r (0.0014 L/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス ($GFR \times f_{up}$, 0.25 L/h/kg) の約 0.6%であることが

示され、やはり腎尿細管で再吸収されるものと考えられた (Table 4)。動物の腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜には各種アミノ酸の再吸収を担う様々なトランスポーターが局在し、各トランスポーターの基質特異性は重複していることが知られている^{31,32)}。これまでに、各トランスポーターに特異的な阻害剤を用いた取り込み実験から、cysteine-*S*-conjugate の一つである *S*-1,2-dichlorovinyl-L-cysteine の再吸収はナトリウム依存的なトランスポーター、あるいはナトリウム非依存的なトランスポーターを介することが報告されている³³⁾。Cysteine-*S*-conjugate の一つである SAC、更には cysteine-*S*-conjugate の *S*-酸化体である SACS も同様のトランスポーターを介して再吸収されているものと考えられた。

一方、NAc-SAC と NAc-SACS の CL_r (1.5 L/h/kg と 1.2 L/h/kg) はそれぞれの糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (0.14 L/h/kg と 0.21 L/h/kg) を大きく上回り (Table 4)、SAC の *N*-アセチル化代謝物は尿中へ能動的に分泌されているものと考えられた。*N*-Acetylcysteine-*S*-conjugate (mercapturic acid) の腎排泄様式に関して幾つかの知見が報告されている。NAc-SAC は mercapturic acid の一つであり、mercapturic acid は腎近位尿細管に存在する Renal Organic Anion Transporter 1 (OAT1) を介して能動的に尿中へ排泄されることが示唆されている^{34,35)}。実際に OAT1 の発現系において、NAc-SAC は OAT1 の基質となる可能性が示されており³⁴⁾、NAc-SAC に加えて NAc-SACS もこの輸送系を介して尿中に分泌されていることが推測された。また、Heuner ら³⁶⁾ はマイクロインフュージョン試験を行い、cysteine-*S*-conjugate の一つである *S*-benzyl-L-cysteine が、ラット腎臓の近位尿細管で *N*-アセチル化を受け、生成した *N*-acetyl-*S*-benzyl-L-cysteine の一部はそのまま尿中へ排泄されることを報告している。同様なことが SAC や SACS にも起きた場合には、SAC、SACS の投与後の尿中に排泄される NAc-SAC、NAc-SACS の中には、腎臓内で SAC、SACS が *N*-アセチル化を受け、そのまま尿中へ排泄されたものの寄与があることになる。この場合、NAc-SAC、NAc-SACS の CL_r は、それぞれの血中濃度を基準として算出されるため、過大評価されることになる。実際に、SAC と SACS の投与後に得られた NAc-SAC と NAc-SACS の CL_r は (2.9 L/h/kg と 4.1 L/h/kg) はそれぞれ、NAc-SAC と NAc-SACS の投与後に得られた値 (1.5 L/h/kg と 1.2 L/h/kg) を大きく上回る値となった (Table 4)。このことは、SAC と SACS の *N*-アセチル化が腎臓内で起きており、SAC、SACS の投与後に得られた NAc-SAC、NAc-SACS の CL_r にはそれぞれ、腎臓内で SAC、SACS から生成し、そのまま尿中に排泄された NAc-SAC、NAc-SACS が少なからず加味されており、SAC、SACS の投与後に得られた NAc-SAC、NAc-SACS の CL_r が過大評価されていることを強く示唆する。このことは、後述するラットの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた *in vitro* 代謝実験の結果からも支持された。即ち、SAC と SACS の *N*-アセチル化活性は両臓器において検出され、特に単位タンパク当たりの CL_{int} は、腎臓の方が顕著に高いことが明らかとなった (Table 5)。更に、NAc-SAC の脱アセチル化活性も両臓器において検出されたが、SAC の *N*-アセチル化活性と比べて 5~7 倍低いことが示され、加えて、肝臓と腎臓には NAc-SACS の脱アセ

チル化活性が検出されなかった (Table 5)。これらの結果より、ラットの肝臓と腎臓において、SAC と SACS の N-アセチル化代謝が起こっており、加えて、尿中に排泄される N-アセチル化代謝物の中には、腎臓において生成し、そのまま尿中排泄を受けたものの寄与があるという腎クリアランスの解析結果が裏付けられた。

また、NAc-SACS の CL_r について、NAc-SAC 投与後と NAc-SACS 投与後に得られた値 (4.9 L/h/kg と 1.2 L/h/kg) を比較すると、NAc-SAC 投与後の方が大きな値を与えていることが分かった (Table 4)。このことから、NAc-SAC の S-酸化についても、少なくとも腎臓内で起こっており、生成した NAc-SACS の一部がそのまま尿中に排泄されており、NAc-SAC 投与後に得られた NAc-SACS の CL_r が過大評価されていることが示唆された。

本研究において、SAC の主な消失経路は N-アセチル化代謝であり、SAC は主に NAc-SAC として尿中へ排泄されることを示した。NAc-SAC は mercapturic acid の一つであるが、mercapturic acid は生体内における一連の酵素反応を介して生成し、その生成は生体内解毒機構として働くと考えられている。多くの外因性および内因性の反応性の高い化合物は肝臓や腎臓に存在する glutathione-S-transferase によって glutathione-S-conjugate へと代謝され、さらに γ -glutamyltranspeptidase と dipeptidase によって順に、cysteinylglycine-S-conjugate、cysteine-S-conjugate へと代謝される。さらに、cysteine-S-conjugate は肝臓や腎臓の N-acetyltransferase によって N-アセチル化を受けて mercapturic acid へと代謝された後、腎臓で能動的に排泄されるという機構である^{33,37-40)}。この cysteine-S-conjugate の N-アセチル化を担う N-acetyltransferase は多くの医薬品のアセチル抱合に関与する酵素とは別のものであり、その酵素活性は肝臓と腎臓において高く、臓器細胞中のミクロソーム画分に局在する⁴¹⁻⁴³⁾。一方、mercapturic acid の脱アセチル化を担う酵素もヒトを始めラットやウサギ等の肝臓と腎臓に存在し⁴⁴⁻⁴⁶⁾、その酵素活性は臓器細胞中のサイトゾル画分に局在する。しかし、これまでに、肝臓と腎臓の細胞画分を用いて、cysteine-S-conjugate の N-アセチル化活性と mercapturic acid の脱アセチル化活性を比較した研究報告はない。本研究においては予備検討を行い、SAC の N-アセチル化と NAc-SAC の脱アセチル化がそれぞれ、ラット肝臓のミクロソーム画分とサイトゾル画分によって進行することを確認した後、肝臓と腎臓の S9 画分による SAC、SACS の N-アセチル化と NAc-SAC、NAc-SACS の脱アセチル化の代謝活性を測定し、両活性の比較を行った (Table 5)。その結果、上述したように、肝臓と腎臓ともに N-アセチル化が脱アセチル化よりも優位であり、両臓器において SAC、SACS がそれぞれ、NAc-SAC、NAc-SACS へと代謝されることが示された。また、両臓器ともに NAc-SACS の脱アセチル化活性が検出されず、NAc-SACS を投与されたラットの尿中 (Table 3) や血漿中 (Fig. 4C) には SACS が検出されないという *in vivo* 結果が裏付けられた。

一方、S-酸化代謝については、ヒトや動物の肝臓と腎臓に存在する flavin-containing monooxygenase

が SAC を SACS へ代謝し、NAc-SAC がラット肝ミクロソーム画分によって S-酸化を受けることが報告されている^{22,47,48)}。しかし、flavin-containing monooxygenase による SAC の S-酸化反応の K_m 値は数 mM であると報告されていることから^{47,48)}、本研究で用いた 5 mg/kg という投与量においては、SAC や NAc-SAC の肝臓中濃度は mM レベルには達せず、肝臓では SAC や NAc-SAC の S-酸化は起きていない可能性が考えられた。実際、本研究においても、ラット、イヌ、およびヒトの肝ミクロソーム画分を用いて SAC と NAc-SAC の S-酸化代謝を血漿中濃度レベルの 5 μ M において予備的に検討したが、いずれの場合にも S-酸化体の生成を認めなかった。一方、腎尿細管上皮細胞における SAC と NAc-SAC の濃度は、再吸収や分泌の能動的過程を通して高濃度となっていることが推測され、SAC と NAc-SAC が腎臓で S-酸化を受けている可能性が考えられた。上述したように、NAc-SAC の投与後に得られた NAc-SACS の CL_r (4.9 L/h/kg) は NAc-SACS の投与後に得られた CL_r (1.2 L/h/kg) よりも大きな値であることが示され、このことから、NAc-SAC が腎臓で S-酸化を受けた後、そのまま尿中へ排泄されていることが示唆された (Table 4)。一方、SAC 投与後に得られた SACS の CL_r の精度には問題があると考えられることから、SAC 投与後と SACS 投与後に得られた SACS の CL_r の比較を行えず、SAC が腎臓で S-酸化を受けるか否かについては考察できなかった。

本研究において、SAC の血中代謝物として GSAC を初めて同定した。 γ -glutamyltranspeptidase は glutathione の γ -グルタミル基をペプチドやアミノ酸、あるいは水分子に転移する反応を触媒することから、SAC から GSAC への代謝も本酵素が関与することが予想される。一方、SAC 投与後の血中に GSAC が検出されるものの、GSAC は尿中や胆汁中には排泄されなかった。このことから、SAC から GSAC への代謝に加えて、GSAC から SAC への代謝も起きている可能性が考えられた。

本研究で得られた知見とこれまでの研究結果をもとに、SAC のラットにおける代謝経路、および代謝と腎排泄を含めた体内挙動のまとめの図をそれぞれ、Fig. 8 と Fig. 9 に示す。

SAC は肝臓や腎臓で N-アセチル化と S-酸化を受けて NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS へと代謝され、SAC から NAc-SACS の生成は NAc-SAC の S-酸化と SACS の N-アセチル化の両経路を介することが示された。また、SACとその代謝物の腎排泄様式は異なり、SACとSACSが腎尿細管で再吸収されるのに対し、SAC の N-アセチル化代謝物 (NAc-SAC と NAc-SACS) は尿中に能動的に分泌されることが示唆された。腎クリアランスの解析結果から、腎臓で生成した NAc-SAC と NAc-SACS の一部は尿中に直接、分泌されることが示され、このことから、血中を循環する NAc-SAC と NAc-SACS は肝臓で生成したものの寄与が高いと推測された。以上の結果は、SAC が未変化体としてはほとんど排泄されず、主に N-アセチル化代謝物 (NAc-SAC と NAc-SACS) として尿中に排泄される理由を明らかにした。即ち、SAC 投与後、血液中を循環する SAC と SACS は腎尿細管での再吸収を介して全身を再循環し、最終的には肝臓や腎臓で N-アセチル化を受けた後、NAc-SAC や NAc-SACS として尿中へ能動的に分泌されることが考えられた。

以上のことから、AGE 中の主要な水溶性イオウ化合物である SAC は消化管から吸収された後、glutathione-S-conjugate から mercapturic acid 生成の解毒排泄機構を介して N-アセチル化代謝物へと代謝された後、腎臓で能動的に排泄されることが明らかになった。

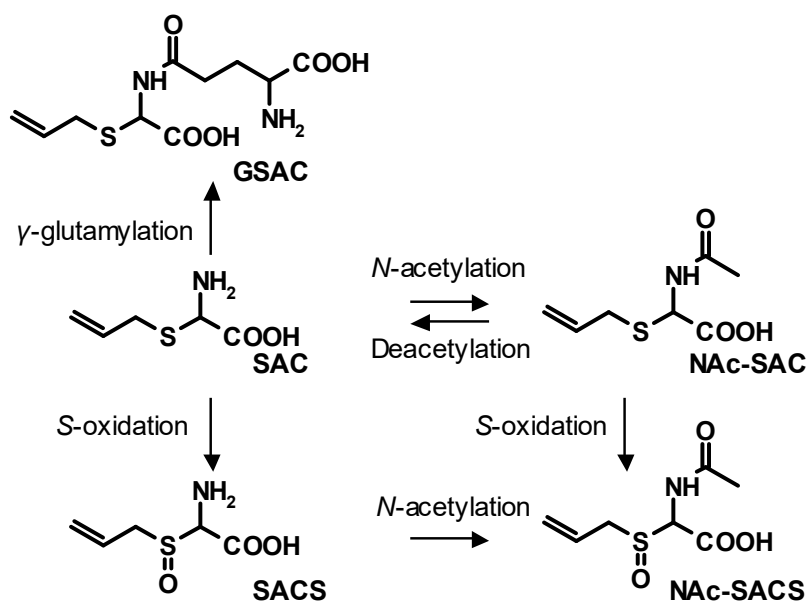


Fig. 8 Postulated metabolism pathway of SAC in rats.

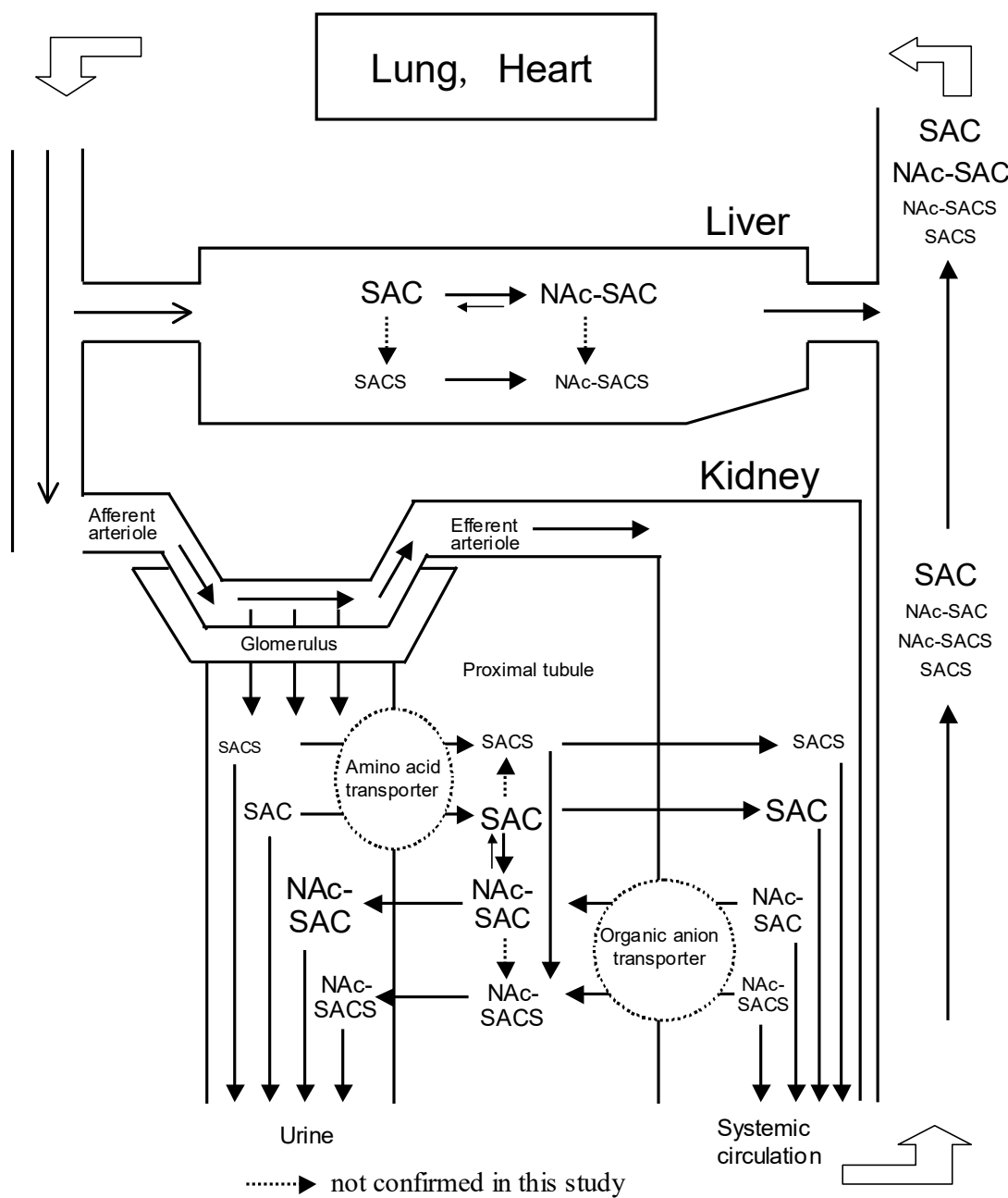


Fig. 9 Postulated pharmacokinetic behavior of SAC and its metabolites in rats.

第Ⅱ章 SAC のイヌにおける代謝、排泄、および血中動態

第Ⅰ章では、ラットにける SAC の代謝、排泄、および血中動態について研究し、SAC の体内挙動には、肝臓と腎臓が重要な役割を果たし、N-アセチル化代謝と脱アセチル化代謝の優位性と SAC と N-アセチル化代謝物の腎排泄様式の違いが大きく影響していることを明らかにした。Nagae ら²⁰⁾はイヌにおける SAC の体内動態を検討し、SAC は経口吸収性に優れ (bioavailability, 87.2%)、その血中濃度は著しく持続し ($t_{1/2}$, 10.2 h)、尿中にはほとんど排泄されない (尿中排泄率, <1%) ことを報告している。しかし、この試験も 25 mg/kg という高用量で実施されており、ヒトでの AGE1 日服用量に含まれる量から考えて、著しく高い用量設定となっている。また、SAC の血中濃度と尿中排泄のみが測定されており、代謝物に関する知見はほとんど得られていない。

本章ではラットでの研究で得られた知見にもとづき、イヌにおける SAC の代謝、排泄、および血中動態を明らかにすることを目的に、*in vivo* と *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。尚、本研究では、Nagae ら²⁰⁾が用いた投与量 (25 mg/kg) よりも 10 倍以上低い 2 mg/kg という用量で試験を行った。2 mg/kg という投与量は、ヒトにおける AGE1 日服用量に含まれる SAC 量から換算した投与量に比べると、依然として 70~140 倍高いが、生成量の少ない代謝物を精度良く分析するために本投与量を採用した。

第1節 N-アセチル化、S-酸化、およびγ-グルタミル化代謝物の同定

本節ではラットで同定された SAC の代謝物に関する知見にもとづき、イヌにおいても同様の代謝物が存在するか否かについて検討した。第Ⅰ章で示したように、ラットにおいては、SAC は未変化体としてはほとんど排泄されず、主に N-アセチル化代謝物である NAc-SAC や NAc-SACS として尿中に排泄されることが明らかとなった。一方、Nagae ら²⁰⁾は、大動物であるイヌにおいては、SAC に加えて NAc-SAC も尿中にほとんど排泄されていない可能性を報告している。これらの結果は、ラットとイヌの間で SAC の N-アセチル化代謝に大きな種差が存在することを示唆する。そこで、本節ではラットでの研究と同様に、SAC をイヌへ投与した後、未変化体 (SAC) とその代謝物 (NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、GSAC) の尿中排泄と血中動態の解析・評価を行い、ラットとの相違を明らかにした。尚、尿と血液のサンプルは同一個体から採取し、分析を行った。

1-a SAC 投与後の未変化体と代謝物の尿中排泄と血中動態

SAC の 2 mg/kg をイヌに経口、あるいは静脈内投与した後、血液を経時的に採取した。また、投与 48 時間後までの尿も併せて採取した。SAC、NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、および GSAC の血漿中と尿

中の濃度を LC-MS/MS にて測定した。

Fig. 10 には、経口あるいは静脈内投与後の SAC とその代謝物の血漿中濃度推移を示す。ラットの場合と同様に、SAC の投与後、NAc-SAC、SACS、NAc-SACS に加えて GSAC が血漿中に出現し、SAC と代謝物の濃度は $\text{SAC} > \text{NAc-SAC} > \text{SACS} > \text{NAc-SACS} > \text{GSAC}$ の順で推移した。この結果から、イヌにおいても NAc-SAC は SAC の主要代謝物であることが示され、SAC とその代謝物の血漿中濃度の大小関係はイヌとラットの間で類似していることが明らかとなった。

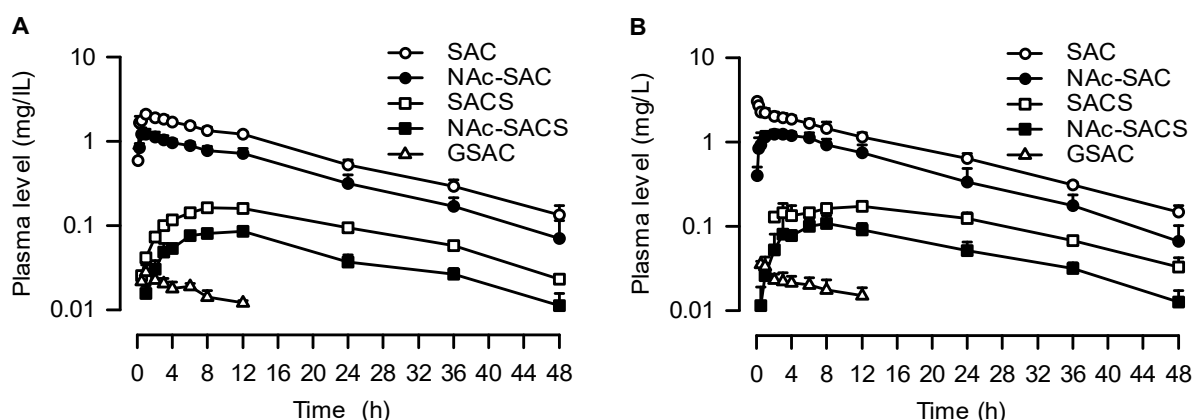


Fig. 10 Plasma concentration-time profiles of SAC, NAc-SAC, SACS, NAc-SACS, and GSAC in dogs after administration of a single dose (2 mg/kg) of SAC (A, oral; B, i.v.). Each point represents mean \pm S.D. of three dogs.

Table 6 には、SAC とその代謝物の尿中排泄率(%、投与量に対する割合)を示す。尚、比較のために、ラットでの尿中排泄データを併せて示している。

Table 6 Urinary excretion of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS in dogs and rats after oral and i.v. administration of SAC^a.

Species		Excretion (% of dose) ^b				
		SAC	NAc-SAC	SACS	NAc-SACS	Total
Dog	i.v.	0.32 \pm 0.07	0.89 \pm 0.18	1.6 \pm 0.87	12 \pm 1.7	14 \pm 2.3
	oral	0.34 \pm 0.19	0.91 \pm 0.44	1.7 \pm 1.4	10 \pm 4.9	13 \pm 6.7
Rat	i.v.	0.95 \pm 0.14	84 \pm 3.9	0.01 \pm 0.01	11 \pm 0.09	96 \pm 3.8
	oral	1.6 \pm 0.92	83 \pm 6.7	0.03 \pm 0.03	11 \pm 2.1	96 \pm 6.4

Data represent mean \pm S.D. of three to four animals.

^aA single oral or i.v. dose of SAC was administered to dogs (2 mg/kg) and rats (5 mg/kg).

^bAmount (% of dose, on a molar basis) of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS excreted in urine of dogs for 48 h postdose and rats for 24 h postdose.

Nagae ら²⁰⁾が報告したように、SAC はイヌの尿中にほとんど排泄されなかった。加えて、NAc-SAC もイヌの尿中にほとんど排泄されないことが示された。SAC の静脈内投与後、SAC、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS の尿中排泄率はそれぞれ、SAC 投与量の 0.32%、0.89%、1.6%、および 12% であっ

た。経口投与後においても、SAC と代謝物ともに静脈内投与後とほぼ同等の排泄率が得られた。このように、イヌにおいても SAC の尿中排泄率、および NAc-SAC 以外の代謝物の尿中排泄率はラットでの排泄率と同程度であることが示されたが、その一方で、NAc-SAC の尿中排泄率にはラットとイヌの間で大きな違いがあることが明らかになった。

Table 7 には、SAC の主要な体内動態パラメータを示す。SAC の bioavailability は 92.0% であり、イヌにおいても経口吸収性に優れていることが示された。SAC の CL_{tot} (48 mL/h/kg) は非常に小さい値を示し、その血漿中濃度は持続し、 $t_{1/2}$ は 12 h と非常に大きい値となった。また、 CL_r (0.15 mL/h/kg) は CL_{tot} の約 0.3% に過ぎず、SAC の主な消失経路は代謝、あるいは胆汁排泄であることが示された。さらに、平衡透析法にて測定した f_{up} とイヌの GFR の報告値 (約 0.36 L/h/kg²⁶) をもとに糸球体ろ過に依存した腎クリアランスを算出 ($GFR \times f_{up}$) すると、290 mL/h/kg (約 360 mL/h/kg²⁶ \times 0.80) という値が得られた。このことから、SAC の CL_r (0.15 mL/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランスの約 0.05% であることが示され、イヌにおいても SAC は腎尿細管で再吸収されることが示唆された。

同様に、SAC の代謝物 (NAc-SAC、SACS、NAc-SACS) の腎排泄様式を解析するために、SAC 投与後に得られた各代謝物の尿中排泄率 (Table 6) と AUC 値 (Table 7) を用いて、それぞれの CL_r を算出した。さらに、SAC 代謝物の糸球体ろ過に依存した腎クリアランスを、平衡透析法にて測定した f_{up} (NAc-SAC 0.66、SACS 0.90、NAc-SACS 0.71) をもとに見積もり、それぞれの CL_r との比較を行った。その結果、SACS の CL_r (6.0 mL/h/kg) は、糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (320 mL/h/kg) の約 1.9% となることが示され、SAC と同様に、SACS も腎尿細管から再吸収されることが示唆された。一方、NAc-SAC と NAc-SACS はラットにおいては尿中へ能動的に分泌されることが示唆されたが、イヌでの腎排泄様式はラットの場合とは異なる可能性が示された。即ち、NAc-SAC の CL_r (0.93 mL/h/kg) は、糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (240 mL/h/kg) の約 0.4% となることが示され、NAc-SAC はイヌにおいては腎尿細管から再吸収される可能性が示された。加えて、NAc-SACS の CL_r (120 mL/h/kg) と糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (260 mL/h/kg) との間に大きな差はなかった。しかし、N-アセチル化代謝物の CL_r については、腎臓における N-アセチル化代謝と脱アセチル化代謝の優劣に依存して異なる影響を受け、過大評価にも過少評価にもつながるので、注意深い考察が必要となる。このことについては、ラットの場合と同様に、N-アセチル化代謝物投与後の体内動態と *in vitro* 代謝を検討することで明らかになると思われる。

Table 7 Pharmacokinetic parameters of SAC in dogs after oral and i.v. administration^a.

Parameters	i.v.	oral
C ₀ or C _{max} (mg/L)	3.2 ± 0.025	2.1 ± 0.14
t _{max} (h)	-	1.3 ± 0.58
t _{1/2} (h) at terminal	12 ± 0.39	12 ± 1.2
CL _{tot} (mL/h/kg)	48 ± 5.7	-
CL _r (mL/h/kg)	0.15 ± 0.017	0.17 ± 0.085
f _{up} ^b		0.80
GFR ^c × f _{up} ^b (mL/h/kg)		290
MRT (h)	17 ± 0.48	17 ± 1.8
Vd _{ss} (L/kg)	0.83 ± 0.10	-
Bioavailability (%)	-	92.0
AUC (mg·h/L)	42.1 ± 4.96	38.7 ± 3.46
MRT (h) of metabolites		
NAC-SAC	16 ± 2.5	-
SACS	24 ± 2.8	-
NAC-SACS	22 ± 1.9	-
GSAC	n.c.	-
AUC (mg·h/L) of metabolites		
NAC-SAC	24.4 ± 6.09	22.7 ± 2.82
SACS	5.90 ± 0.59	4.92 ± 0.26
NAC-SACS	2.85 ± 0.56	2.32 ± 0.23
GSAC	0.51 ± 0.24	0.41 ± 0.053
CL _r (mL/h/kg) of metabolites		
NAC-SAC	0.93 ± 0.047	0.98 ± 0.40
SACS	6.0 ± 3.5	7.3 ± 5.8
NAC-SACS	120 ± 37	120 ± 51
GSAC	n.c.	n.c.

Data represent mean ± S.D. of three dogs. n.c., not calculated.

^aA single oral or i.v. dose (2 mg/kg) of SAC was administered to dogs.

^bf_{up} was determined *in vitro* by using an equilibrium dialysis device. ^cGFR, 360 mL/h/kg²⁶⁾.

第2節 代謝経路の推定

第1節で示されたように、SACはイヌにおいてもN-アセチル化、S-酸化、およびγ-グルタミル化を受け、代謝物としてNAC-SAC、SACS、NAC-SACS、およびGSACが生成することが明らかとなった。このうち、NAC-SACSは、ラットで示されたようにNAC-SACのS-酸化とSACSのN-アセチル化の両経路で生成することが可能である。第2節ではSACの代謝経路を明らかにすることを目的に、NAC-SAC、SACS、あるいはNAC-SACSをイヌに静脈内投与し、それらの尿中排泄と血中動態の解析・評価を行った。また、SACのN-アセチル化代謝を担う臓器とその代謝活性、および代謝の種差を明らかにすることを目的に、イヌとヒトの肝臓と腎臓のS9画分を用いた*in vitro*代謝試験を行った。

2-a NAc-SAC、SACS、NAc-SACS の投与後の尿中排泄と血中動態

NAc-SAC、SACS、あるいは NAc-SACS の 2 mg/kg をイヌに静脈内投与した後、血液を経時的に採取した。また、投与 48 時間後までの尿も併せて採取した。SAC、NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、および GSAC の血漿中と尿中の濃度を LC-MS/MS にて測定した。

Table 8 には、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS の投与後の尿中排泄率(%、投与量に対する割合)を示す。尚、比較のために、イヌでの SAC 投与後のデータとラットでの SAC と代謝物(NAc-SAC、SACS、NAc-SACS)の投与後のデータを併せて示している。

Table 8 Urinary excretion of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS in dogs and rats after i.v. administration.

Compound ^a	Species	Excretion (% of dose) ^b				
		SAC	NAc-SAC	SACS	NAc-SACS	Total
SAC	Dog	0.32 ± 0.07	0.89 ± 0.18	1.6 ± 0.87	12 ± 1.7	14 ± 2.3
NAc-SAC		0.49 ± 0.06	1.8 ± 0.54	1.8 ± 0.47	12 ± 3.0	16 ± 3.6
SACS		n.d.	n.d.	5.6 ± 2.3	22 ± 4.0	27 ± 4.3
NAc-SACS		n.d.	n.d.	2.5 ± 1.1	82 ± 5.8	85 ± 4.7
SAC	Rat	0.95 ± 0.14	84 ± 3.9	0.01 ± 0.01	11 ± 0.09	96 ± 3.8
NAc-SAC		1.8 ± 0.53	84 ± 0.91	0.02 ± 0.03	12 ± 2.1	98 ± 3.1
SACS		n.d.	n.d.	0.10 ± 0.01	85 ± 4.6	86 ± 4.1
NAc-SACS		n.d.	n.d.	n.d.	96 ± 2.2	96 ± 2.2

Data represent mean ± S.D. of three to four animals. n.d., not detected.

^aA single i.v. dose of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS was administered to dogs (2 mg/kg) and rats (5 mg/kg).

^bAmount (% of dose, on a molar basis) of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS excreted in urine of dogs for 48 h postdose and rats for 24 h postdose.

まず、NAc-SACは未変化体として、尿中にほとんど排泄されなかった。NAc-SACの静脈内投与後、尿中に排泄された SAC、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS の量はそれぞれ、投与量の 0.49%、1.8%、1.8%、および 12%であり、SAC 投与後のそれぞれの尿中排泄率と同程度の値となった。また、NAc-SAC 投与後の尿中に SAC と NAc-SACS が排泄されたことから、ラットの場合と同様に、NAc-SAC は脱アセチル化と S-酸化を受けることが示唆された。一方、NAc-SACS はイヌにおいても代謝的に安定であり、その投与量の 82%が未変化体として尿中に排泄された。しかし、NAc-SACS 投与量の 2.5% が SACS として尿中に排泄されたことから、ラットの場合とは異なり、イヌでは NAc-SAC の脱アセチル化に加えて NAc-SACS の脱アセチル化も起こることが示された。さらに、SACS はその投与量の 22% が NAc-SACS として尿中に排泄されたことから、イヌにおいても N-アセチル化を受けることが示された。しかし、尿中へ排泄された SACS と NAc-SACS の合計は SACS 投与量の 27%に過ぎないこと、加えて、NAc-SACS は主に尿中へ排泄されることが示されたことから、投与された SACS の大部分は胆汁中へ

排泄されている可能性、あるいは未知の代謝物へ代謝されている可能性が示された。

Fig. 11A には、NAc-SAC の静脈内投与後、血漿中に出現した SAC、NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、および GSAC の濃度推移を示す。NAc-SAC 投与後の尿中に SAC と NAc-SACS が排泄された結果と整合して、SAC と NAc-SACS が血漿中に検出された。このことから、イヌにおいても SAC の N-アセチル化に加えて NAc-SAC の脱アセチル化も起こることが示され、加えて、SAC から NAc-SACS の生成は NAc-SAC の S-酸化を経由する可能性が示された。

Fig. 11B には、SACS の静脈内投与後、血漿中に出現した SACS と NAc-SACS の濃度推移を示す。SACS 投与後には、投与量の 22%が NAc-SACS として尿中へ排泄されたが、血漿中においても、SACS の濃度の減少に応じて NAc-SACS が出現することが確認された。また、SACS 投与後の血中と尿中に NAc-SAC が検出されなかったことから、SAC から NAc-SACS の生成は少なくとも SACS の N-アセチル化を経由することが示された。Fig. 11C には、NAc-SACS の静脈内投与後、血漿中に出現した NAc-SACS と SACS の濃度推移を示す。NAc-SACS 投与後には、唯一の代謝物として投与量の 2.5%が SACS として尿中へ排泄されたが、血漿中においても、NAc-SACS の濃度の減少に応じて SACS が出現した。以上の結果から、イヌにおいては、ラットの場合と同様に SACS の N-アセチル化が起こり、ラットの場合とは異なり NAc-SACS の脱アセチル化も起こることが明らかとなった。

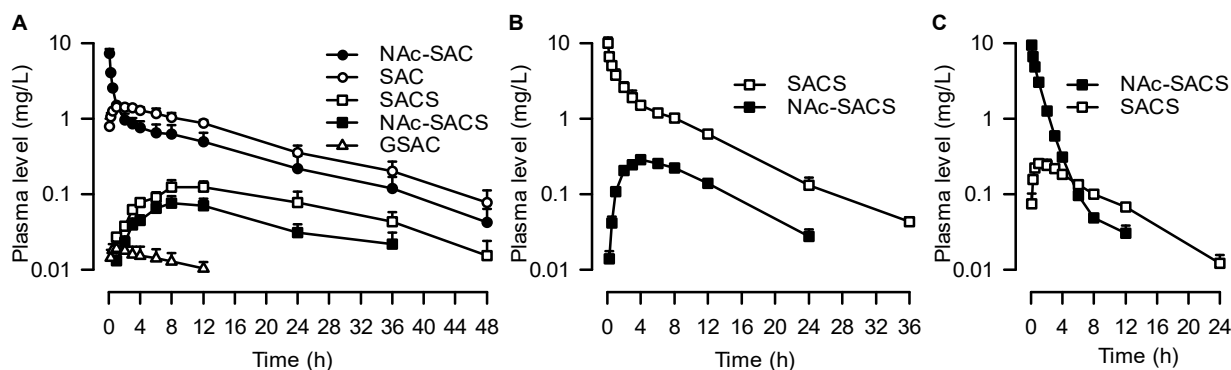


Fig. 11 Plasma concentration-time profiles of SAC, NAc-SAC, SACS, NAc-SACS, and GSAC in dogs after administration of a single i.v. dose (2 mg/kg) of NAc-SAC (A), SACS (B), and NAc-SACS (C). Each point represents mean \pm S.D. of three dogs.

Table 9 には、NAC-SAC、SACS、および NAc-SACS の主要な体内動態パラメータを示す。尚、比較のために、SAC の体内動態パラメータを併せて示している。まず、SAC と代謝物(NAC-SAC、SACS、NAc-SACS)の Vd_{ss} は 0.32~1.3 L/kg であり、ラットの場合と同定度の値(0.45~1.0 L/kg)となった。SAC とその代謝物は水溶性が高く、イヌにおいても血漿蛋白とある程度、結合することから(f_{up} は0.66~0.90)、組織への移行性は低く、その Vd_{ss} はイヌの全水分量(0.60 L/kg²⁶⁾)と同定度の値になったと思われる。また、LC-MS/MS 分析における逆相カラムでの保持時間から判断して、SACS や NAc-SACS は SAC や NAc-SAC に比べて水溶性が高いと考えられ、このことが SACS や NAc-SACS の Vd_{ss} がより小さな値になった理由と思われた。

NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS の CL_r は親化合物である SAC を静脈内投与した後に得られた値と同程度であった。SACS 投与後の SACS の CL_r (4.2 mL/h/kg) は CL_{tot} (74 mL/h/kg) の約 5.6% に過ぎず、 CL_{tot} に占める CL_r の割合は著しく小さいことが示された。また、SACS の CL_r は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス($GFR \times f_{up} = 320$ mL/h/kg)の約 1.3%と算出された。これらのことから、SACS の主な消失経路は代謝や胆汁排泄と考えられ、ラットの場合と同様に、腎排泄の過程においては腎尿細管で再吸収を受けることが改めて示唆された。一方、NAc-SAC 投与後の NAc-SAC の CL_r (1.8 mL/h/kg) も CL_{tot} (110 mL/h/kg) の約 1.6% に過ぎず、ラットの場合とは異なり、NAc-SAC の血漿中からの消失は腎排泄に依存しないことが示された。さらに、NAc-SAC の CL_r (1.8 mL/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス($GFR \times f_{up} = 240$ mL/h/kg)の約 0.76%であり、イヌにおいては腎尿細管で再吸収される可能性が改めて示された。しかし、イヌの腎臓が強力な NAc-SAC の脱アセチル化活性を有し、腎臓に到達した NAc-SAC が尿中に排泄される過程で SAC へ代謝される場合、その血漿中濃度を基準として算出される CL_r は小さな値となり、 CL_r の過少評価になるので注意が必要である。この可能性は腎 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験を実施することで検証できると考えた。また、NAc-SACS 投与後の NAc-SACS の CL_r (170 mL/h/kg) は CL_{tot} の値(200 mL/h/kg) にほぼ近い値であり、ラットの場合と同様に、本代謝物の消失機構は腎排泄であることが示された。同時に、NAc-SACS の CL_r は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス($GFR \times f_{up} = 260$ mL/h/kg)との間に大きな差を認めず、イヌにおいては主に糸球体ろ過により尿中に排泄されていることが示唆された。しかし、この場合も、イヌの腎臓が強力な NAc-SACS の脱アセチル化活性を有する場合、その CL_r は過少評価されることに繋がるので注意が必要である。

さらに、SACS と NAc-SACS の腎クリアランスについて解析を行い、腎臓における SAC と NAc-SAC の S-酸化代謝についても検討した。SAC 投与後、NAc-SAC 投与後に得られた SACS、NAc-SACS の CL_r (6.0 mL/h/kg と 130 mL/h/kg) はそれぞれ、SACS 投与後、NAc-SACS 投与後に得られた SACS、NAc-SACS の値(4.2 mL/h/kg と 170 mL/h/kg)との間に大きな差を認めず (Table 9)、SAC と NAc-SAC

が腎臓で S-酸化を受けることを示唆する知見は得られなかった。

Table 9 Pharmacokinetic parameters of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS in dogs after i.v. administration.

Parameters	Dosed compounds			
	SAC ^a	NAc-SAC ^a	SACS ^a	NAc-SACS ^a
C ₀ (mg/L)	3.2 ± 0.025	9.7 ± 2.1	12 ± 3.3	11 ± 1.0
CL _{tot} (mL/h/kg)	48 ± 5.7	110 ± 31	74 ± 9.8	200 ± 9.0
t _{1/2} (h) at terminal	12 ± 0.39	11 ± 1.5	6.0 ± 0.28	3.9 ± 0.85
CL _r (mL/h/kg)	0.15 ± 0.017	1.8 ± 0.13	4.2 ± 1.7	170 ± 6.6
f _{up} ^b	0.80	0.66	0.90	0.71
GFR ^c × f _{up} ^b (mL/h/kg)	290	240	320	260
MRT (h)	17 ± 0.48	13 ± 2.8	6.8 ± 0.27	1.6 ± 0.16
Vd _{ss} (L/kg)	0.83 ± 0.10	1.3 ± 0.10	0.51 ± 0.059	0.32 ± 0.023
AUC (mg·h/L)	42.1 ± 4.96	19.4 ± 4.87	27.2 ± 3.43	9.94 ± 0.44
MRT (h) of metabolites				
SAC	-	16 ± 2.5	-	-
NAc-SAC	16 ± 2.5	-	-	-
SACS	24 ± 2.8	22 ± 2.2	-	7.6 ± 0.38
NAc-SACS	22 ± 1.9	22 ± 2.9	10 ± 0.81	-
GSAC	n.c.	n.c.	-	-
AUC (mg·h/L) of metabolites				
SAC	-	27.6 ± 4.46	n.d.	n.d.
NAc-SAC	24.4 ± 6.09	-	n.d.	n.d.
SACS	5.90 ± 0.59	3.58 ± 1.04	-	2.32 ± 0.21
NAc-SACS	2.85 ± 0.56	1.94 ± 0.54	3.70 ± 0.18	-
GSAC	0.51 ± 0.24	0.33 ± 0.093	n.d.	n.d.
CL _r (mL/h/kg) of metabolites				
SAC	-	0.28 ± 0.016	-	-
NAc-SAC	0.93 ± 0.047	-	-	-
SACS	6.0 ± 3.5	9.7 ± 4.1	-	18 ± 8.9
NAc-SACS	120 ± 37	130 ± 3.6	150 ± 23	-

Data represent mean ± S.D. of three dogs. n.d., not detected. n.c., not calculated.

^aA single i.v. dose (2 mg/kg) of SAC, NAc-SAC, SACS, and NAc-SACS was administered to dogs.

^bf_{up} was determined *in vitro* by using an equilibrium dialysis device. ^cGFR, 360 mL/h/kg²⁶).

2-b 肝および腎 S9 画分による *in vitro* 代謝と種差

SAC、NAc-SAC、SACS、および NAc-SACS のイヌ体内動態試験において、SAC と SACS は N-アセチル化を受けること、および NAc-SAC と NAc-SACS は脱アセチル化を受けることが示された。

そこで、イヌの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験を行い、SAC の N-アセチル化と NAc-SAC の脱アセチル化について、それぞれの CL_{int}を算出し、両代謝活性の比較を行った。同様に、SACS の N-アセチル化と NAc-SACS の脱アセチル化の代謝活性についても比較を行った。さらに、動

物とヒトの間での代謝の種差を明らかにする目的で、ヒトの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた試験も併せて実施した。尚、N-アセチル化と脱アセチル化の CL_{int} は、ラット S9 画分を用いた試験の場合と同様に解析・算出した。

最初に、イヌの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた試験の結果を示す。

NAc-SAC と NAc-SACS の脱アセチル化反応の $CL_{int, deacetylation}$ はそれぞれ、NAc-SAC と NAc-SACS の消失速度から求めた。尚、予備検討により、脱アセチル化以外の代謝が起こらないことを確認した。

NAc-SAC の脱アセチル化について、NAc-SAC の残存濃度の自然対数値-反応時間プロットを線形最小二乗法によって解析し、得られた $slope$ を蛋白濃度で除することで CL_{int} ($CL_{int, deacetylation}$) を算出した。この解析により、肝 S9 画分での NAc-SAC の脱アセチル化反応の $CL_{int, deacetylation}$ は $0.45 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein (Fig. 12A)、腎 S9 画分での $CL_{int, deacetylation}$ は $460 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein (Fig. 12B) と算出された。

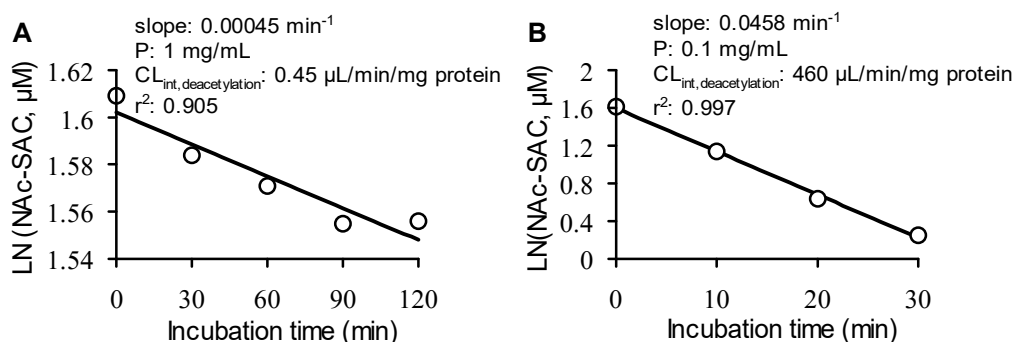


Fig. 12 Concentration of NAc-SAC remained-time plots in the incubation mixtures for NAc-SAC deacetylation by dog liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

NAc-SACS の脱アセチル化についても同様の解析を行い、 $CL_{int, deacetylation}$ を算出した。肝 S9 画分には NAc-SACS の脱アセチル化活性が検出されなかったが、腎 S9 画分には検出された。しかし、腎 S9 画分の NAc-SACS の脱アセチル化活性は低く、NAc-SACS の残存濃度の測定値をもとに算出した $CL_{int, deacetylation}$ の値は精度が悪いと考えられた。そこで、NAc-SACS の初期濃度 ($5 \mu\text{M}$) から SACS の生成濃度の測定値を差し引いた値をもとに $CL_{int, deacetylation}$ を算出したところ、Fig. 13 に示すように、決定係数の高い直線が得られ、その $CL_{int, deacetylation}$ は $0.18 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ と算出された。

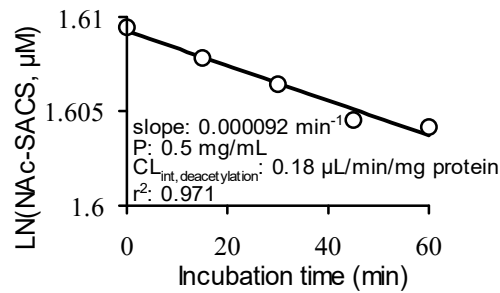


Fig. 13 Concentration of NAc-SACS remained-time plot in the incubation mixtures for NAc-SACS deacetylation by dog kidney S9 fraction.

Fig. 14 には、イヌの肝臓と腎臓の S9 画分による SAC の N-アセチル化反応について、 $CL_{int,acetylation}$ を算出するために用いたプロットを示した。肝 S9 画分による N-アセチル化反応では、SAC の N-アセチル化速度と NAc-SAC の脱アセチル化速度が平衡に達するまで SAC の N-アセチル化が進行しなかった。そこで、SAC の消失速度から $CL_{int,acetylation}$ を算出した。尚、予備検討により、SAC の N-アセチル化以外の代謝が起こらないことを確認した。SAC の残存濃度の自然対数値-反応時間プロットを線形最小二乗法によって解析し、得られた解析結果から、 $CL_{int,acetylation}$ は $0.56 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ と算出された (Fig. 14A)。一方、腎 S9 画分による N-アセチル化反応では、N-アセチル化と脱アセチル化の速度が平衡に達するまで SAC の N-アセチル化が進行した。そこで、NAc-SAC の生成濃度を反応時間に対してプロットし、前章と同様に式 6 と式 7 を用いて解析した結果、 $CL_{int,acetylation}$ は $5.9 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ と算出された (Fig. 14B)。

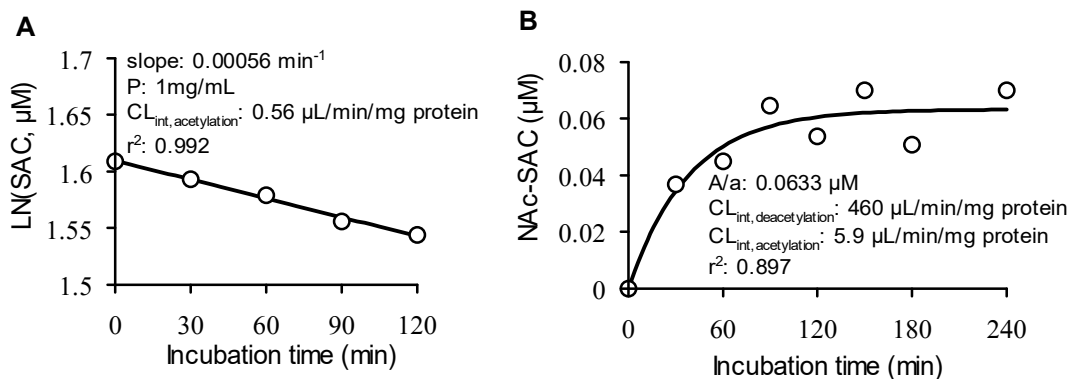


Fig. 14 Concentration of SAC remained-time plot in the incubation mixtures for SAC N-acetylation by dog liver S9 fraction (A), and concentration of NAc-SAC formed-time plot in the incubation mixtures for SAC N-acetylation by dog kidney S9 fraction (B).

Fig. 15 には、イヌの肝臓と腎臓の S9 画分による SACS の N-アセチル化反応について、 $CL_{int,acetylation}$ を算出するために用いたプロットを示した。上述したように、肝 S9 画分には NAc-SACS の脱アセチル化活性が検出されなかった。一方、腎 S9 画分による SACS の N-アセチル化反応では、SACS の N-ア

セチル化速度と NAc-SACS の脱アセチル化速度が平衡に達するまで SACS の N-アセチル化が進行しなかった。そこで、両 S9 画分における SACS の N-アセチル化反応の $CL_{int,acetylation}$ は、SACS の消失速度から算出した。尚、予備検討により、SACS の N-アセチル化以外の代謝が起こらないことを確認した。イヌの肝 S9 画分と腎 S9 画分の SACS の N-アセチル化活性はともに低かったことから、SACS の初期濃度 (5 μ M) から NAc-SACS の生成濃度を差し引いた値をもとに $CL_{int,deacetylation}$ 算出した。Fig. 15 に示すように、決定係数の高い直線が得られ、肝 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は 0.056 μ L/min/mg protein (Fig. 15A)、腎 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は 0.12 μ L/min/mg protein (Fig. 15B) と算出された。

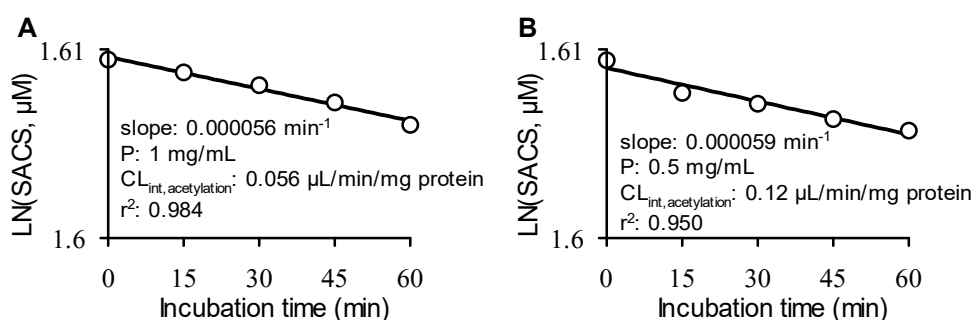


Fig. 15 Concentration of SACS remained-time plots in the incubation mixtures for SACS N-acetylation by dog liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

次に、ヒトの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた試験の結果を示す。

イヌの S9 画分を用いた試験と同様に、NAc-SAC の脱アセチル化反応の $CL_{int,deacetylation}$ は NAc-SAC の消失速度から求めた。尚、予備検討により、脱アセチル化以外の代謝が起こらないことを確認した。NAc-SAC の残存濃度の自然対数値-反応時間プロットを線形最小二乗法によって解析し、得られた解析結果から、肝 S9 画分での $CL_{int,deacetylation}$ は 14 μ L/min/mg protein (Fig. 16A)、腎 S9 画分での $CL_{int,deacetylation}$ は 34 μ L/min/mg protein (Fig. 16B) と算出された。一方、ヒトの肝臓と腎臓の S9 画分には NAc-SACS の脱アセチル化活性が検出されなかった。

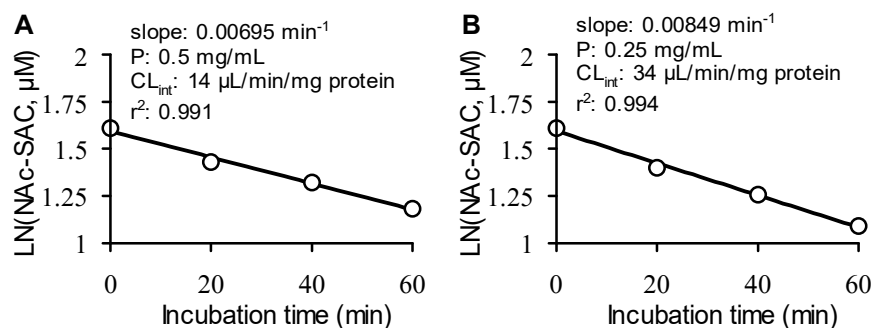


Fig. 16 Concentration of NAc-SAC remained-time plots in the incubation mixtures for NAc-SAC deacetylation by human liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

Fig. 17 には、ヒトの肝臓と腎臓の S9 画分による SAC の N-アセチル化反応について、 $CL_{int,acetylation}$ を算出するために用いたプロットを示した。NAc-SAC の生成濃度を反応時間に対してプロットし、前章と同様に式 6 と式 7 を用いて解析した結果、肝 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は $1.0 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 17A)、腎 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は $4.9 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 17B) と算出された。

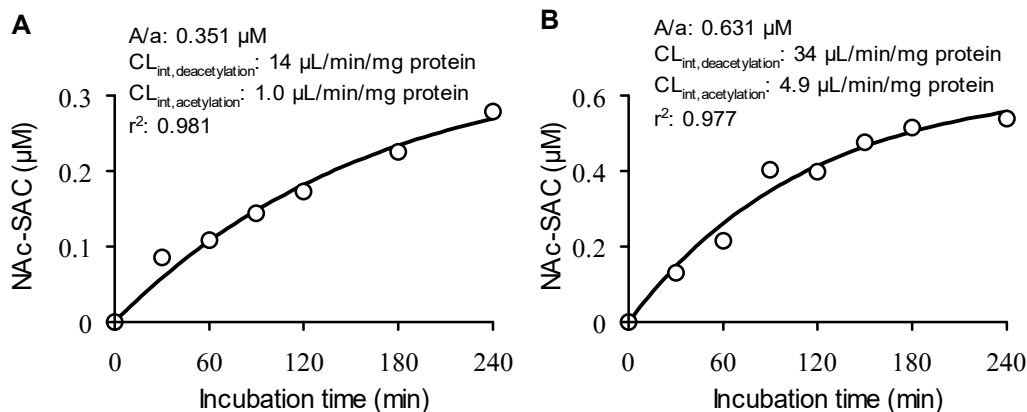


Fig. 17 Concentration of NAc-SAC formed-time plots in the incubation mixtures for SAC *N*-acetylation by human liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

上述したように、ヒトの肝臓と腎臓の S9 画分には NAc-SACS の脱アセチル化活性が検出されなかったため、SACS の N-アセチル化反応の $CL_{int,acetylation}$ は SACS の消失速度から算出した。尚、予備検討により、SACS の N-アセチル化以外の代謝が起こらないことを確認した。ヒトの肝 S9 画分と腎 S9 画分の SACS の N-アセチル化活性はともに低かったことから、SACS の初期濃度 ($5 \mu\text{M}$) から NAc-SACS の生成濃度を差し引いた値をもとに $CL_{int,deacetylation}$ を算出した。Fig. 18 に示すように、決定係数の高い直線が得られ、肝 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は $0.045 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 18A)、腎 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は $0.22 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 18B) と算出された。

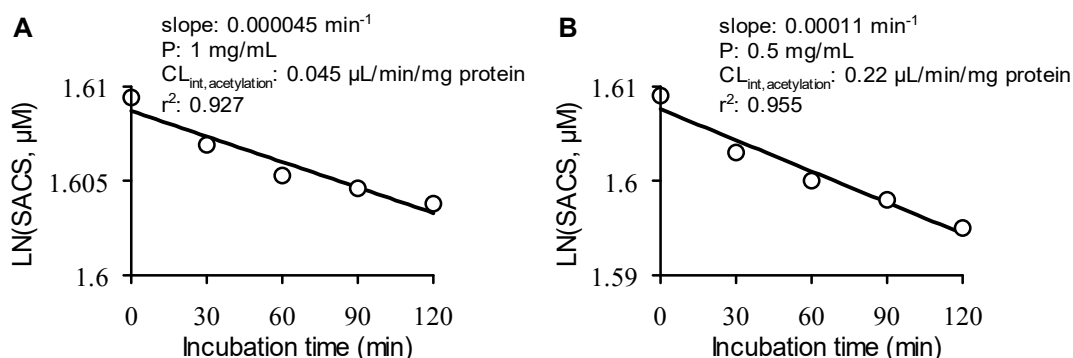


Fig. 18 Concentration of SACS remained-time plots in the incubation mixtures for SACS *N*-acetylation by human liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

Table 10 に結果のまとめを示す。尚、比較のために、ラット S9 画分でのデータを併せて示している。

また、 CL_{int} は S9 蛋白量当たりの値に加えて、体重 kg 当たりの値も併せて算出した。イヌの肝臓と腎臓は SAC の N-アセチル化活性と NAc-SAC の脱アセチル化活性を有することが明らかとなった。しかし、両活性の優位性は肝臓と腎臓で大きく異なり、肝臓では SAC の N-アセチル化と NAc-SAC の脱アセチル化の代謝活性が同程度であるのに対し、腎臓は強力な脱アセチル化活性を有し、その活性は N-アセチル化活性よりも約 80 倍高いことが示された。この結果は、肝臓で SAC から NAc-SAC が生成し、腎臓では逆に NAc-SAC が SAC へ代謝されることを強く示唆する。一方、SACS の N-アセチル化活性と NAc-SACS の脱アセチル化活性については、イヌの肝臓が SACS の N-アセチル化活性のみを有するのに対し、腎臓は SACS の N-アセチル化と NAc-SACS の脱アセチル化の活性を有し、両活性の大きさは同程度であることが示された。

さらに、ラット、イヌ、およびヒトの肝臓と腎臓の SAC の N-アセチル化活性と NAc-SAC の脱アセチル化活性の比較から、SAC の N-アセチル化代謝には種差があることが明らかとなった。ラットともイヌとも異なり、ヒトの肝臓と腎臓の NAc-SAC の脱アセチル化活性は SAC の N-アセチル化活性よりも 7~14 倍高く、ヒトにおいては脱アセチル化が優位であり、SAC から NAc-SAC の生成が起こり難いことが示唆された。また、ラットの場合と同様に、ヒトの肝臓と腎臓はともに SACS の N-アセチル化活性を示すが、NAc-SACS の脱アセチル化活性は示さないという結果が得られた。

Table 10 CL_{int} values for *N*-acetylation of SAC and SACS and for deacetylation of NAc-SAC and NAc-SACS by liver and kidney S9 fractions of rat, dog, and human.

S9 by liver and kidney S9 fractions of rat, dog, and human.					
Species	S9	<i>N</i> -acetylation of		Deacetylation of	
		SAC	SACS	NAc-SAC	NAc-SACS
$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein					
Rat	Liver	30	0.55	5.9	n.d.
	Kidney	190	13	27	n.d.
Dog	Liver	0.56	0.056	0.45	n.d.
	Kidney	5.9	0.12	460	0.18
Human	Liver	1.0	0.045	14	n.d.
	Kidney	4.9	0.22	34	n.d.
$\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$ body weight					
Rat ^{a)}	Liver ^{d)}	148	2.7	28	n.d.
	Kidney ^{e)}	142	10	20	n.d.
Dog ^{b)}	Liver ^{d)}	2.2	0.22	1.7	n.d.
	Kidney ^{e)}	2.7	0.055	214	0.086
Human ^{c)}	Liver ^{d)}	3.3	0.14	43	n.d.
	Kidney ^{e)}	2.0	0.09	14	n.d.

^{a)}40 g liver/kg body weight, 8.0 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{b)}32 g liver/kg body weight, 5.0 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{c)}26 g liver/kg body weight, 4.4 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{d)}121 mg S9 protein/g liver²⁷⁾. ^{e)}93.5 mg S9 protein/g kidney²⁷⁾. n.d., not detected.

第3節 考察

第II章では、第I章のラットでの研究で得られた知見にもとづき、SACのイヌでの体内動態、およびその代謝物の全容と代謝経路を明らかにすることを目的として、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。また、LC-MS/MS法を用いることで、SACとその代謝物を高感度に定量分析することが可能となり、これまでの研究での投与量(25 mg/kg²⁰)と比べて、10倍以上低い用量(2 mg/kg)で *in vivo* 試験を実施した。

まず、SACのイヌにける bioavailability は 92.0%であり、SACの経口吸収性はイヌにおいても優れており、その血中濃度は持続する($t_{1/2}$, 12 h)ことが明らかとなった。Zhengら⁴⁹⁻⁵¹⁾はSACの類縁体である *S*-propargyl-L-cysteine のラットやイヌでの体内動態を試験し、*S*-propargyl-L-cysteine も経口吸収性に優れ(bioavailability, 95~112%)、ラットにおいては未変化体として排泄されず、N-アセチル化代謝を受けること、およびイヌにおいてはその血中濃度が持続する($t_{1/2}$, 15 h)ことを報告している。このことは、構造上の *S*-2-propenyl 基と *S*-2-propynyl 基の違いは、化合物の経口吸収性、尿中排泄、あるいはN-アセチル化代謝に大きく影響しないことを示唆している。

本研究において、SACのラットへの投与後に検出された全ての血中代謝物(NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、GSAC)が、イヌへの投与後の血漿中に検出された(Fig. 10AとFig. 10B)。SACの経口および静脈内投与後、SACとその代謝物の血漿中濃度は SAC>NAc-SAC>>SACS>NAc-SACS>>GSACの順で推移し、ラットの場合と同様に、イヌにおいてもSACの濃度はどの代謝物の濃度よりも高く推移し、NAc-SACが主要代謝物であることが示された(Fig. 10AとFig. 10B)。Nagaeら²⁰⁾はSACのイヌへの投与後に、SACが尿中へほとんど排泄されないことを報告したが、本研究においてもSAC投与後の尿中にSACとSACSはほとんど排泄されなかった(Table 6)。ラットにおいては、SACとSACSは腎尿細管から再吸収されるのに対し、NAc-SACとNAc-SACSは尿中に能動的に分泌されることが示された。イヌにおいても、SACとSACSの CL_r は、それぞれの糸球体ろ過に依存した腎クリアランスに比べて顕著に小さいことが示され、腎臓で再吸収を受けているものと考えられた(Table 9)。一方、NAc-SACとNAc-SACSの尿中排泄については、ラットとイヌの間で異なる結果が得られた。NAc-SACSについては、ラットの場合と同様に、腎排泄が主な消失経路であることが確認されたが、その CL_r は糸球体ろ過に依存した腎クリアランスとの間に大きな差を認めず、NAc-SACSが尿中に分泌されるという結果は得られなかった(Table 9)。しかし、S9画分を用いた *in vitro* 代謝の結果から、イヌ腎臓のNAc-SACSの脱アセチル化活性はSACSのN-アセチル化活性よりも若干高いことが明らかとなり(Table 10)、このことから、腎排泄過程でNAc-SACSの一部はSACSへ代謝されていることが示唆され、NAc-SACSの CL_r が過少評価されている可能性が示された。さらに、ラットの場合とは異なり、

NAc-SAC はイヌの尿中にはほとんど排泄されなかった (Table 6)。この理由を明らかにするために *in vitro* 代謝試験を行った結果、NAc-SAC は腎臓で SAC へ代謝されている可能性が極めて強く示された。即ち、イヌ腎臓の NAc-SAC の脱アセチル化活性は SAC の N-アセチル化活性に比べて約 80 倍高いことが明らかになり (Table 10)、NAc-SAC は腎排泄の過程で脱アセチル化を受けることが強く示唆された。従って、SAC の主要代謝物である NAc-SAC は、糸球体ろ過後の尿細管上皮組織を透過する過程で、あるいは血中から尿中へ分泌される過程で、そのほとんどが SAC へ代謝された後に再吸収されていると考えられ、このことが SAC の血中濃度が極めて持続することに大きく寄与しているものと考えられた。また、SAC とその代謝物 (NAc-SAC、SACS、NAc-SACS) の総尿中排泄率は SAC 投与量の約 13~14% しか説明できないが (Table 6)、上述したように、主要代謝物である NAc-SAC が腎臓で SAC へ代謝されている可能性が強く示されたことから、SAC と NAc-SAC が最終的に胆汁へ排泄されている可能性が考えられた。その一方で、イヌにおいては、ラットの場合には存在しない未知の代謝物へ代謝されている可能性も考えられた。また、SAC のような cysteine-S-conjugate がイヌの胆汁中に排泄されるという報告はないが、NAc-SAC と同じく mercapturic acid の一つである dinitrophenyl-N-acetylcysteine が、ラットの胆汁中に能動的に排泄されることが報告されている⁵²⁾。

ラットと同様に、SAC から NAc-SACS の代謝経路についても検討した。NAc-SAC と SACS の静脈内投与後に、ともに NAc-SACS が血漿中に出現し (Fig. 11A と Fig. 11B)、イヌにおいても、NAc-SACS は NAc-SAC の S-酸化と SACS の N-アセチル化の両経路で生成することが示された。一方、ラットの場合とは異なり、NAc-SACS の静脈内投与後に SACS が血漿中に検出され (Fig. 11C)、イヌでは NAc-SACS の脱アセチル化も起こることが明らかとなった。このことは、*in vitro* 代謝試験の結果によって裏付けられ、上述したように、イヌの腎臓は NAc-SAC の脱アセチル化活性に加えて NAc-SACS の脱アセチル化活性も有することが示された (Table 10)。

本研究で得られた知見をもとに、SAC のイヌにおける代謝経路、および代謝と腎排泄を含めた体内挙動のまとめの図をそれぞれ、Fig. 19 と Fig. 20 に示す。ラットの場合と同様に、イヌにおいても SAC は N-アセチル化、S-酸化、および γ -グルタミル化を受け、代謝物として NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、および GSAC が生成する。また、*in vitro* 代謝試験と腎クリアランスの解析結果から、イヌにおいては主要代謝物である NAc-SAC が尿中へほとんど排泄されず、かつ SAC の $t_{1/2}$ が極めて長い理由が示された。即ち、イヌの腎臓は強力な NAc-SAC の脱アセチル化活性を有することが明らかになり、このことから、NAc-SAC は腎臓での排泄過程でそのほとんどが SAC へ代謝されていると考えられ、同じく糸球体ろ過された SAC と一緒に再吸収を介して全身を再循環することになり、その血中濃度は持続するものと考えられた ($t_{1/2}$, 12 h)。

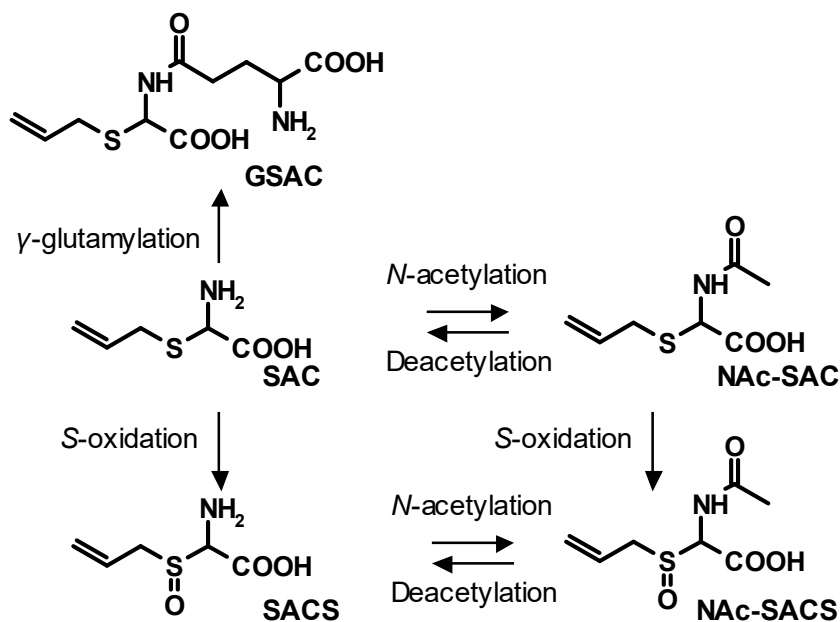


Fig. 19 Postulated metabolism pathway of SAC in dogs.

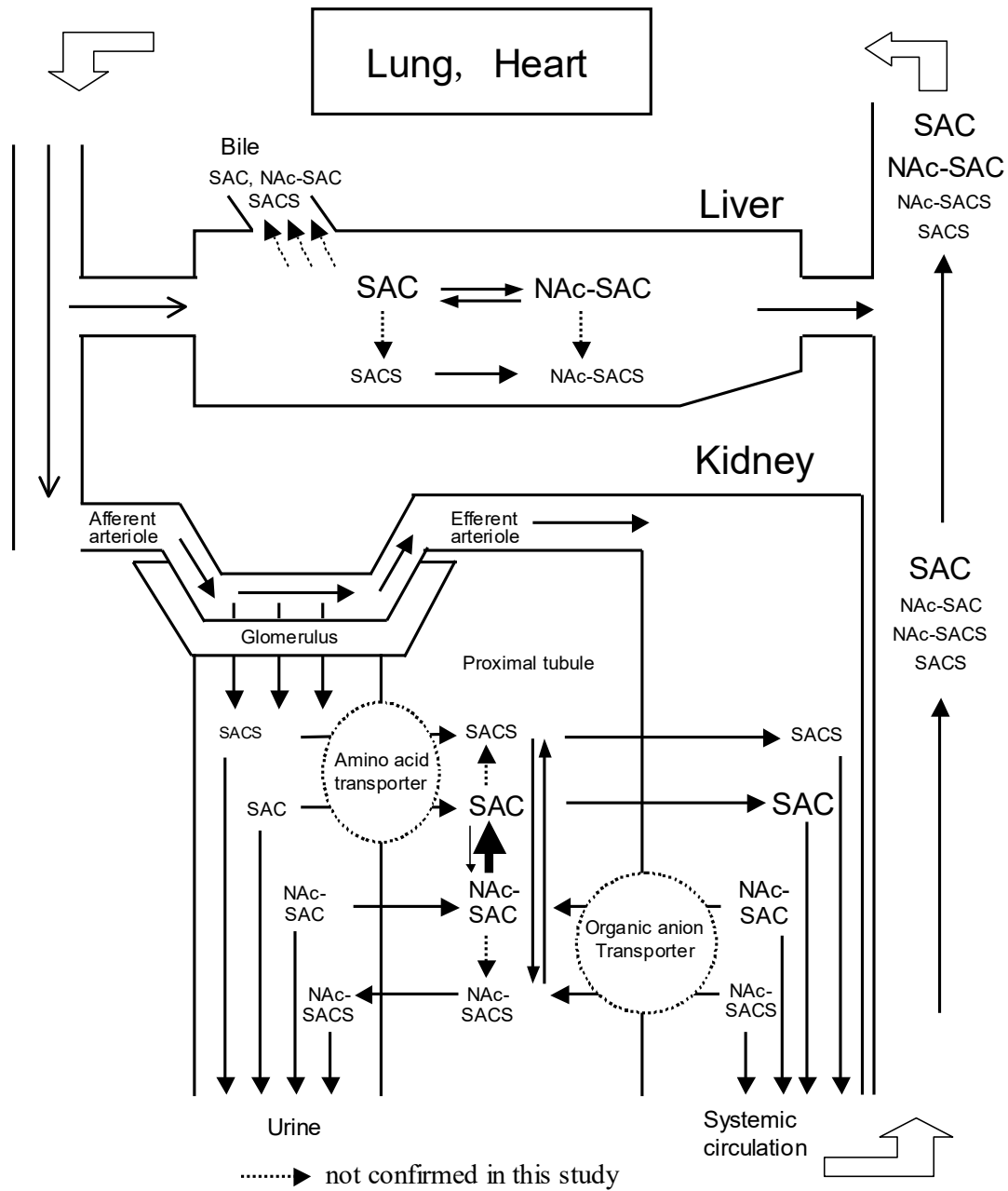


Fig. 20 Postulated pharmacokinetic behavior of SAC and its metabolites in dogs.

本研究での *in vitro* 代謝試験の結果から、肝臓と腎臓の SAC の N-アセチル化活性と NAc-SAC の脱アセチル化活性の優位性にはラット、イヌ、およびヒトの間に大きな種差があることが明らかとなった。ラットの肝臓と腎臓では、SAC の N-アセチル化活性が NAc-SAC の脱アセチル化活性に比し 5~7 倍高いのに対し、イヌの肝臓では N-アセチル化と脱アセチル化の活性がほぼ同等であり、イヌの腎臓には強力な脱アセチル化活性が検出された。一方、ヒトの肝臓と腎臓においては、NAc-SAC の脱アセチル化活性が SAC の N-アセチル化活性よりも 7~14 倍高いことが示された (Table 10)。これまでに、cysteine-S-conjugate の N-アセチル化代謝と対応する mercapturic acid の脱アセチル化代謝の種差を *in vivo* と *in vitro* で検討した報告例はないが、本研究において、N-アセチル化と脱アセチル化の活性の優位性は動物種で異なり、著しい種差があることが明らかになった。また、第 I 章と本章におけるラットとイヌでの研究において、S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験の結果は、*in vivo* 試験の結果に良く反映されており、さらに NAc-SAC がイヌの尿中にはほとんど排泄されないという結果をも説明できた。このことは、肝臓と腎臓が N-アセチル化と脱アセチル化を担う主要な臓器であることを強く示唆している。特に、腎臓における N-アセチル化と脱アセチル化の優位性は SAC から NAc-SAC への代謝(ラット)、あるいは逆の NAc-SAC から SAC への代謝(イヌ)を介して、SAC の血中濃度の持続性に大きな影響を及ぼすものと考えられた。さらに、*in vitro* 代謝試験の結果は、ヒトでは SAC から NAc-SAC への代謝が起こり難いことが示唆された。また、ラット、イヌ、およびヒトの肝臓と腎臓において、SAC の N-アセチル化活性は SACS の N-アセチル化活性よりも 10 倍以上強く、NAc-SAC の脱アセチル化活性は NAc-SACS の脱アセチル化活性よりも著しく強いことが示された (Table 10)。これらの結果から、cysteine-S-conjugate (SAC) の S-酸化体 (SACS) は cysteine-S-conjugate の N-アセチル化を担う *N*-acetyltransferase⁴¹⁻⁴³⁾ の基質になり難く、mercapturic acid (NAc-SAC) の S-酸化体 (NAc-SACS) は mercapturic acid の脱アセチル化を担う acylase⁴⁴⁻⁴⁶⁾ の基質になり難いことが示された。

第 I 章と第 II 章において、ラットとイヌにおける SAC の代謝、排泄、および血中動態に関する研究を行い、ヒトでの体内動態試験を実施するための知見を得た。今後、N-アセチル化代謝の種差も含めて SAC のヒトでの体内動態が明らかになることが期待される。

第 III 章 SMC と SIPC のラットとイヌにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態

第 I 章と第 II 章において、AGE 中の代表的な水溶性イオウ化合物である SAC のラットとイヌでの代謝、排泄、および血中動態について研究し、SAC は様々な種類の代謝(N-アセチル化、S-酸化、およびγ-グルタミル化)を受け、代謝物として NAc-SAC、SACS、NAc-SACS、および GSAC が生成することを示した。また、ラットとイヌにおける SAC とその代謝物の体内動態は、主要代謝物 NAc-SAC の尿中排泄が異なる以外は極めて類似していることを示した。さらに、N-アセチル化代謝物の生成の速度と程度は肝臓と腎臓の N-アセチル化代謝と脱アセチル化代謝の優位性によって決定され、特に腎臓はその代謝(N-アセチル化と脱アセチル化の優位性)と排泄(再吸収と分泌の寄与)を介して、SAC とその代謝物の体内挙動に大きく影響を及ぼすことを明らかにした。

本章では SAC の研究で得られた知見をもとに、AGE 中の他の主要な水溶性イオウ化合物である SMC と SIPC の代謝、排泄、および血中動態を明らかにすることを目的として、ラットとイヌを用いて研究を行った。また、代謝については、SAC の主要な消失経路が NAc-SAC や NAc-SACS への代謝であったことから、特に N-アセチル化代謝に焦点を当てて研究を行った。尚、SMC と SIPC の S-酸化体については純度の高い標品を調製できなかったため、検討できなかった。

第 1 節 SMC の N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態

水溶性イオウ化合物である SMC は去痰剤として臨床で使用されているが、加えて、肝臓に対する化学予防効果¹⁷⁾、糖尿病進展に対する遅延効果¹⁸⁾、あるいはパーキンソン様症状に対する予防効果¹⁹⁾等、SMC の有用な薬理作用が動物実験レベルで示されている。しかし、SMC の体内動態に関しては、ヒト健常人への SMC の投与後に総システインの血漿中濃度が増加したという報告があるのみで、SMC の血中動態を調べた研究はない。一方、SMC の代謝に関しては幾つかの研究が実施されており、SMC はラットやヒトにおいては未変化体としては尿中へほとんど排泄されず、経口投与された量の約 50%が無機イオウ化合物として尿中に排泄されることが報告されている²³⁻²⁵⁾。このように、SMC の尿中代謝物に関する知見は得られているものの、その体内動態には不明の部分が多い。

このような背景のもと、本節では、ラットとイヌにおける SMC の体内動態とその N-アセチル化代謝を明らかにすることを目的として、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。尚、*in vivo* 試験に用いた投与量はラットとイヌともに、2 mg/kg に設定した。この 2 mg/kg という用量は、AGE1 日服用量に含まれる SMC 量(0.1~0.2 mg)から換算した投与量(体重を 70 kg とした)と比べて、700~1400 倍高い値である。

1-a ラットにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態

ラットにおける SMC の N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態を明らかにする目的で、SMC、*N*-acetyl-*S*-methyl-L-cysteine (NAc-SMC)、あるいは *N*-acetyl-*S*-methyl-L-cysteine sulfoxide (NAc-SMCS) の投与後、SMC と N-アセチル化代謝物 (NAc-SMC と NAc-SMCS) の尿・胆汁中排泄と血中動態の解析・評価を行った。尚、尿・胆汁中排泄と血中動態の試験は別々に実施した。

SMC、NAc-SMC、NAc-SMCS の 2 mg/kg をラットに経口、あるいは静脈内投与した後、尿と胆汁を 24 時間採取し、尿・胆汁中に排泄された SMC、NAc-SMC、および NAc-SMCS を LC-MS/MS にて測定した。尚、尿は無処置ラットから、胆汁は胆管にカニキュレーションを施したラットから、別々に採取した。

Table 11 には、SMC と N-アセチル化代謝物 (NAc-SMC と NAc-SMCS) の尿・胆汁中排泄率(%, 投与量に対する割合)を示す。まず、SMC には内因性のものが存在し、24 時間の間に無投与ラットの尿と胆汁に排泄された量はそれぞれ、 33 ± 14 と 227 ± 23 $\mu\text{g/kg}$ (mean \pm S.D.) であった。さらに、NAc-SMC と NAc-SMCS にも内因性のものが存在し、無投与ラットの 24 時間尿に排泄された量はそれぞれ、 249 ± 102 と 142 ± 71 $\mu\text{g/kg}$ (mena \pm S.D.) であった。このように、SMC とその N-アセチル化代謝物は内因性に尿や胆汁中に排泄されることが明らかとなったため、尿・胆汁中排泄率の算出では化合物投与後の排泄量から無投与ラットでの排泄量を差し引くことによって補正した。

SMC の静脈内投与後、投与量の 4.9%が未変化体として胆汁中に排泄され、N-アセチル化代謝物である NAc-SMC と NAc-SMCS は胆汁中に排泄されなかった。一方、尿中に排泄された SMC、NAc-SMC、および NAc-SMCS の量はそれぞれ、SMC 投与量の 1.8%、13%、および 10%であった。経口投与後においても、SMC と N-アセチル化代謝物ともに静脈内投与後とほぼ同等の尿・胆汁中排泄率が得られた。このように、SMC の静脈内投与後に尿と胆汁中に排泄された未変化体と N-アセチル化代謝物の合計は SMC 投与量の約 30%に過ぎないことから、報告されているように²⁴⁾、投与された SMC 量の多くは無機イオウ化合物として尿中へ排泄されたものと思われた。

NAc-SMC の静脈内投与後、SMC、NAc-SMC、および NAc-SMCS の尿中排泄率はそれぞれ、投与量の 0.56%、11%、および 10%であり、SMC と N-アセチル化代謝物 (NAc-SMC と NAc-SMCS) の尿中排泄率は SMC を静脈内投与した場合とほぼ同程度の排泄率となった。NAc-SMC 投与後の尿中に SMC と NAc-SMCS が排泄されたことから、NAc-SAC と同様に、NAc-SMC も脱アセチル化と S-酸化を受けることが示唆された。さらに、NAc-SMCS の静脈内投与後、未変化体である NAc-SMCS は胆汁中には全く排泄されず、主に尿中に排泄されることが示された。しかし、NAc-SMCS の尿中排泄量は投与量の 63%しか説明できず、残りの約 40%は代謝を受けたものと推測された。本研究では検討できな

かったが、SAC での研究で得られた知見から、投与された NAc-SMCS の一部は脱アセチル化を受け、SMC sulfoxide へ代謝されている可能性が考えられた。

Table 11. Urinary and biliary excretion of SMC, NAc-SMC, and NAc-SMCS in rats after oral and i.v. administration.

Compound ^a	Excreta		Excretion (% of Dose) ^b			
			SMC	NAc-SMC	NAc-SMCS	Total
SMC	urine	i.v.	1.8 ± 0.58	13 ± 3.6	10 ± 2.4	25 ± 5.7
		oral	0.60 ± 0.62	13 ± 1.9	11 ± 2.6	24 ± 4.9
	bile	i.v.	4.9 ± 1.6	n.d.	n.d.	4.9 ± 1.6
		oral	7.2 ± 2.3	n.d.	n.d.	7.2 ± 2.3
NAc-SMC	urine	i.v.	0.56 ± 0.98	11 ± 6.3	10 ± 2.9	22 ± 8.1
	bile	i.v.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
NAc-SMCS	urine	i.v.	n.d.	n.d.	63 ± 9.0	63 ± 9.0
	bile	i.v.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Data represent mean ± S.D. of three rats. n.d., not detected. n.e., not examined.

^aA single oral or i.v. dose (2 mg/kg) of SMC, NAc-SMC, and NAc-SMCS was administered to intact and bile duct-cannulated rats.

^bExcreted amount (% of dose, on a molar basis) of SMC, NAc-SMC, and NAc-SMCS in urine and bile for 24 h postdose, which was corrected by subtracting each baseline amount.

次に、SMCとそのN-アセチル化代謝物 (NAc-SMCとNAc-SMCS) の血中動態を解析した。尿・胆汁中に検出されたように、ラットの血漿中にも内因性のSMC、NAc-SMC、およびNAc-SMCSが検出された。NAc-SMCSの濃度は定量限界値以下であるために定量できなかったが、化合物投与前のSMCとNAc-SMCの血漿中濃度はそれぞれ、0.18~0.28 mg/Lと 0.002~0.006 mg/Lであった。また、内因性のSMCやN-アセチル化代謝物の血漿中濃度には日内変動がほとんどないことが確認された。このことから、SMCとN-アセチル化代謝物の体内動態パラメータは化合物投与後の血漿中濃度から化合物投与前の濃度を差し引いた値をもとに、解析・算出した。

SMCの投与後、血漿中に出現したSMCとN-アセチル化代謝物 (NAc-SMCとNAc-SMCS) の濃度推移をFig. 21A (経口投与) とFig. 21B (静脈内投与) に示す。まず、NAc-SMCSは血漿中にほとんど出現せず、その濃度はSMC投与前のベースライン濃度を推移した (0.003 mg/mL 以下)。このことから、SMC投与後に尿中に排泄されたNAc-SMCSの多くは腎臓で生成したものが、そのまま尿中へ排泄されたものであることが示唆された。また、NAc-SMCの血漿中濃度はSMC濃度と比較して著しく低く推移し、SMC静脈内投与後のNAc-SMCのAUC (0.097 mg·h/L) はSMCのAUC (6.24 mg·h/L) の約1.5%であることが示された (Table 12)。さらに、NAc-SMCの静脈内投与後、その血漿中濃度の急速な減少に応じてSMCが血漿中に出現し、SMCはNAc-SMCよりも著しく高い濃度で推移した (Fig. 21C)。これらの結果から、ラットにおいてはSMCのN-アセチル化に比べてNAc-SMCの脱アセチル化が優

位であることが示され、このことが、SMC 投与後の血漿中に出現する NAc-SMC の濃度が SMC 濃度に比べて著しく低い理由であると考えられた。また、NAc-SMC の静脈内投与後に NAc-SMCS が尿中に排泄された結果と整合して、NAc-SMC の静脈内投与後の血漿中に NAc-SMCS が検出された (Fig. 21C)。このことから、SMC から NAc-SMCS の生成は少なくとも NAc-SMC の S-酸化を経由することが示唆された。

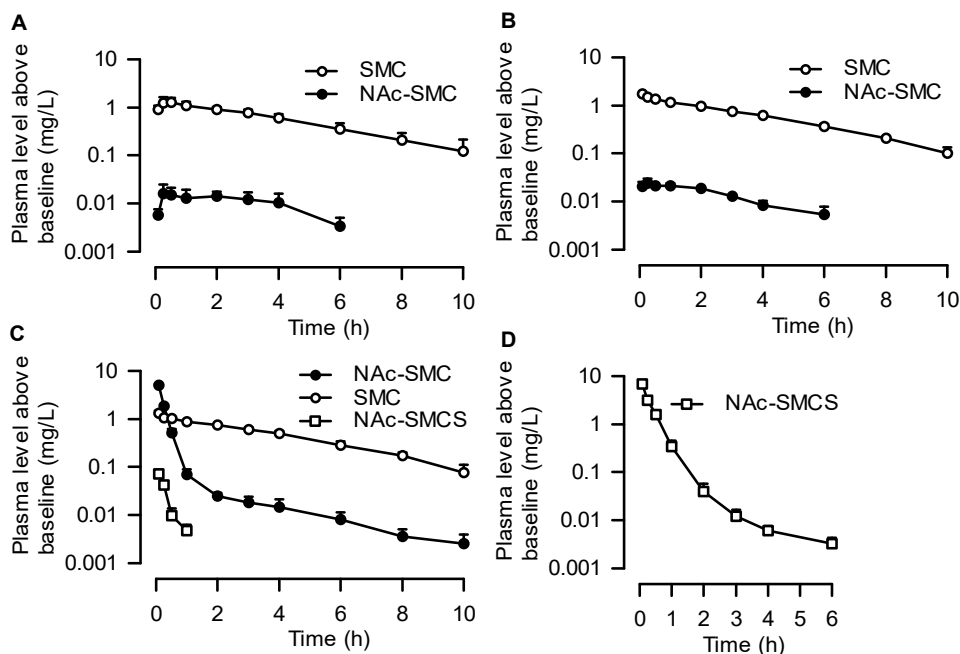


Fig. 21 Plasma concentration-time profiles of SMC, NAc-SMC, and NAc-SMCS in rats after administration of a single dose (2 mg/kg) of SMC (A, oral; B, i.v.), NAc-SMC (C, i.v.), and NAc-SMCS (D, i.v.). Each point represents mean \pm S.D. of three to four rats.

Table 12 には、SMC、NAc-SMC、および NAc-SMCS の主要な体内動態パラメータを示す。SMC は経口吸収性に優れ、その bioavailability は 95.8% であった。また、 $t_{1/2}$ 、 CL_{tot} 、および Vd_{ss} はそれぞれ、2.6 h、0.32 L/h/kg、および 1.2 L/kg であった。 CL_r (0.0059 L/h/kg) は CL_{tot} の約 1.8% に過ぎず、SAC と同様に、SMC の血漿中からの消失のほとんどが代謝に依存していることが示された。また、SMC とその代謝物である NAc-SMC、NAc-SMCS の Vd_{ss} はそれぞれ、1.2、0.54、0.22 L/kg であった。LC-MS/MS 分析における逆相カラムでの保持時間から判断して、NAc-SMC や NAc-SMCS は SMC に比べて水溶性が高いと考えられ、加えて、血漿蛋白との結合性も強いため (f_{up} ; SMC 0.96, NAc-SMC 0.74, NAc-SMCS 0.73)、組織への移行性が低く、その Vd_{ss} はより小さな値になったと思われる。

Table 12. Pharmacokinetic parameters of SMC, NAc-SMC, and NAc-SMCS in rats after oral and i.v. administration.

Parameters ^b	SMC ^a		NAc-SMC ^a	NAc-SMCS ^a
	i.v.	oral	i.v.	i.v.
C ₀ or C _{max} (mg/L)	1.9 ± 0.091	1.3 ± 0.33	8.2 ± 1.1	10 ± 0.96
t _{max} (h)	-	0.42 ± 0.14	-	-
t _{1/2} (h) at terminal	2.6 ± 0.22	2.6 ± 0.75	2.1 ± 0.54	0.36 ± 0.029
CL _{tot} (L/h/kg)	0.32 ± 0.033	-	1.2 ± 0.072	0.71 ± 0.081
CL _r (L/h/kg)	0.0059	0.0020	0.14	0.45
f _{up} ^c		0.96	0.74	0.73
GFR ^d × f _{up} ^c (L/h/kg)		0.29	0.22	0.22
MRT (h)	3.8 ± 0.27	4.1 ± 0.81	0.45 ± 0.16	0.32 ± 0.028
Vd _{ss} (L/kg)	1.2 ± 0.045	-	0.54 ± 0.19	0.22 ± 0.022
Bioavailability (%)	-	95.8	-	-
AUC (mg·h/L)	6.24 ± 0.61	5.98 ± 1.73	1.67 ± 0.10	2.83 ± 0.33
MRT (h) of metabolites				
SMC	-	-	4.0 ± 0.58	-
NAc-SMC	n.c.	-	-	-
NAc-SMCS	-	-	n.c.	-
AUC (mg·h/L) of metabolites				
SMC	-	-	4.87 ± 0.51	n.d.
NAc-SMC	0.097 ± 0.012	0.067 ± 0.024	-	n.d.
NAc-SMCS	n.d.	n.d.	0.024 ± 0.004	-
CL _r (L/h/kg) of metabolites				
SMC	-	-	0.0018	-
NAc-SMC	3.4	5.0	-	-
NAc-SMCS	-	-	9.2	-

Data represent mean ± S.D. of three to four rats. n.d., not detected. n.c., not calculated.

^aA single oral or i.v. dose (2 mg/kg) of SMC, NAc-SMC, and NAc-SMCS was administered to rats.

^bPharmacokinetic parameters were calculated from baseline-subtracted plasma concentration-time data.

^cf_{up} was determined *in vitro* by using an equilibrium dialysis device. ^dGFR, 0.30 L/h/kg²⁶.

さらに、SMC とその N-アセチル化代謝物 (NAc-SMC と NAc-SMCS) の腎排泄様式を明らかにするために、腎クリアランスの解析を行った。平衡透析法にて測定した f_{up} とラットの GFR の報告値 (約 0.3 L/h/kg²⁶) をもとに SMC の糸球体ろ過に依存した腎クリアランスを算出 (GFR × f_{up}) すると、0.29 L/h/kg (約 0.3 L/h/kg²⁶ × 0.96) という値が得られた。このことから、SMC の CL_r (0.0059 L/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランスの約 2% であることが示され、SMC は腎尿細管で再吸収されることが示唆された。SMC と同様に、NAc-SMC と NAc-SMCS についても、平衡透析法にて測定した f_{up} (NAc-SAC 0.74, NAc-SACS 0.73) をもとに糸球体ろ過に依存した腎クリアランスを算出し、それぞれの CL_r と比較した。その結果、SMC 投与後に得られた尿中排泄率 (Table 11) と AUC (Table 12) の値を用いて算出した SMC 投与後の NAc-SMC の CL_r (3.4 L/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (約 0.3 L/h/kg²⁶) ×

0.74 = 0.22 L/h/kg)を大きく上回り、尿中に分泌されている可能性が示された。その一方で、NAc-SMC投与後に得られたNAc-SMCの CL_r (0.14 L/h/kg)は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス(0.22 L/h/kg)と同定度の値になることが示された。上述したように、SMCとNAc-SMCの体内動態試験の結果から、SMCのN-アセチル化よりもNAc-SMCの脱アセチル化が優位であることが示されており、腎臓内でNAc-SMCが脱アセチル化を受け、そのまま尿中へ排泄された場合、血漿中濃度を基準として算出されるNAc-SMCの CL_r は過少評価されることになる。NAc-SMC投与後に得られたNAc-SMCの CL_r がSMC投与後に得られた値よりも著しく小さい値になるという結果は、この可能性を強く示唆する。このことは腎S9画分を用いた*in vitro*代謝試験を行うことで明らかになると思われる。一方、NAc-SMCS投与後に得られたNAc-SMCSの CL_r (0.45 L/h/kg)は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス(約0.3 L/h/kg²⁶) $\times 0.73 = 0.22$ L/h/kg)よりも約2倍大きく、NAc-SMCSも尿中へ能動的に分泌されることが示唆された。

1-b イヌにおけるN-アセチル化代謝、排泄、および血中動態

イヌにおけるSMCのN-アセチル化代謝、尿中排泄、および血中動態を明らかにすることを目的に、試験を行った。SMCの2 mg/kgをイヌに経口、あるいは静脈内投与した後、血液を経時的に採取した。また、投与48時間後までの尿も併せて採取した。SMC、NAc-SMC、およびNAc-SMCSの血漿中と尿中の濃度をLC-MS/MSにて測定した。

SMC投与後に血漿中に出現した未変化体(SMC)とN-アセチル化代謝物(NAc-SMCとNAc-SMCS)の濃度推移をFig. 22A(経口投与)とFig. 22B(静脈内投与)に示す。ラットの場合と同様に、イヌの血漿中にも内因性のSMC、NAc-SMC、およびNAc-SMCSが検出され、それぞれの化合物投与前の濃度は0.30~0.45 mg/L、0.003~0.007 mg/L、および0.02~0.03 mg/Lであった。イヌにおいても内因性のSMCやN-アセチル化代謝物の血漿中濃度には日内変動がほとんどないことが確認されたため、化合物投与後の血漿中濃度は化合物投与前の値を差し引くことで補正した。ラットの場合と同様に、SMC投与後のNAc-SMCの血漿中濃度はSMC濃度と比較して著しく低く推移し、SMC静脈内投与後のNAc-SMCのAUC(0.57 mg·h/L)はSMCのAUC(42.8 mg·h/L)の約1.3%であることが示された(Table 14)。また、NAc-SMCSは血漿中にはほとんど出現せず、その血漿中濃度はSMC投与前の濃度とほぼ同じ値で推移した。これらの結果から、イヌにおいてもSMCからNAc-SMCの生成は起こり難く、肝臓や腎臓におけるNAc-SMCの脱アセチル化活性はSMCのN-アセチル化活性より優位である可能性が示された。このことは、イヌの肝臓と腎臓のS9画分を用いた*in vitro*代謝試験を行うことで、明らかになると思われる。

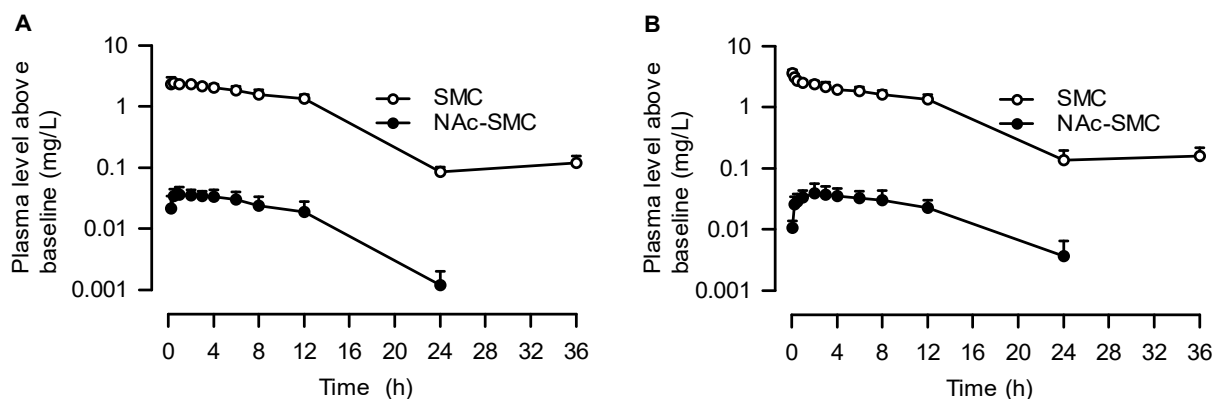


Fig. 22 Plasma concentration-time profiles of SMC and NAc-SMC in dogs after administration of a single dose (2 mg/kg) of SMC (A, oral; B, i.v.). Each point represents mean \pm S.D. of three dogs.

Table 13 には、SMC の経口、あるいは静脈内投与後の未変化体(SMC)と N-アセチル化代謝物(NAc-SMCとNAc-SMCS)の尿中排泄率(%、投与量に対する割合)を示す。尚、比較のために、ラットでの尿中排泄データを併せて示している。イヌにおいても内因性の SMC、NAc-SMC、および NAc-SMCS が尿中に検出され、無投与イヌの 24 時間尿に排泄された量はそれぞれ、 1.9 ± 0.53 、 1.5 ± 0.43 、および $4.5 \pm 2.6 \mu\text{g/kg}$ (mean \pm S.D.)であった。従って、尿中排泄率の算出においては、化合物投与後の排泄量から無投与イヌでの排泄量を差し引くことによって補正した。

Table 13. Urinary excretion of SMC, NAc-SMC, and NAc-SMCS in dogs and rats after oral and i.v. administration of SMC^a.

Species		Excretion (% of dose) ^b			
		SMC	NAc-SMC	NAc-SMCS	Total
Dog	i.v.	0.20 ± 0.16	n.d.	0.52 ± 0.31	0.72 ± 0.42
	oral	0.12 ± 0.11	n.d.	0.70 ± 0.26	0.82 ± 0.35
Rat	i.v.	1.8 ± 0.58	13 ± 3.6	10 ± 2.4	25 ± 5.7
	oral	0.60 ± 0.62	13 ± 1.9	11 ± 2.6	24 ± 4.9

Data represent mean \pm S.D. of three animals. n.d., not detected.

^aA single oral or i.v. dose (2 mg/kg) of SMC was administered to dogs and rats.

^bExcreted amount (% of dose, on a molar basis) of SMC, NAc-SMC, NAc-SMCS in urine of dogs for 48 h postdose and rats for 24 h postdose, which was corrected by subtracting each baseline amount.

SMC の静脈内投与後と経口投与後に尿中排泄された SMC の量はそれぞれ、投与量の 0.20%と 0.12%であり、ラットの場合と同様に、SMC はイヌの尿中にほとんど排泄されなかった。また、SMC の N-アセチル化代謝物(NAc-SMCとNAc-SMCS)も尿中にほとんど排泄されず、NAc-SMC の尿中排泄量は内因性の排泄量との間に差を認めず、SMC 投与量の 0.52%(静脈内投与)と 0.70%(経口投与)が NAc-SMCS として排泄された。

Table 14 には、SMC の主要な体内動態パラメータを示す。ラットの場合と同様に、SMC はイヌにおいても経口吸収性に優れ、その bioavailability は 95.5% であった。SMC の CL_{tot} (48 mL/h/kg) は非常に小さい値であり、その血漿中濃度は持続し、 $t_{1/2}$ は 8.0~8.9 h であった。また、 CL_r (0.086 mL/h/kg) は CL_{tot} の約 0.18% に過ぎず、SMC の主な消失経路は代謝、あるいは胆汁排泄であることが示された。さらに、SMC の糸球体ろ過に依存した腎クリアランスを見積もると、330 mL/h/kg ($GFR \times f_{up} = \text{約 } 360 \text{ mL/h/kg}^{26}) \times 0.91$) という値が得られた。このことから、SMC の CL_r (0.086 mL/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランスの約 0.03% であることが示され、イヌにおいても SMC は腎尿細管で再吸収されることが示唆された。一方、SMC の投与後に、NAc-SMC は尿中にほとんど排泄されなかったこと、および NAc-SMCS の血漿中濃度は SMC 投与前の濃度との間にほとんど差を認めなかったことから、これらの N-アセチル化代謝物の CL_r を精度よく算出することができず、腎排泄様式の解析には至らなかった。

Table 14 Pharmacokinetic parameters of SMC in dogs after oral and i.v. administration^a.

Parameters ^b	i.v.	oral
C_0 or C_{max} (mg/L)	4.0 ± 0.57	2.6 ± 0.20
t_{max} (h)	-	0.33 ± 0.14
$t_{1/2}$ (h) at terminal	8.9 ± 1.3	8.0 ± 1.1
CL_{tot} (mL/h/kg)	48 ± 7.9	-
CL_r (mL/h/kg)	0.086 ± 0.064	0.056 ± 0.048
f_{up}^c	0.91	
$GFR^d \times f_{up}^c$ (mL/h/kg)	330	
MRT (h)	11 ± 1.6	11 ± 1.0
Vd_{ss} (L/kg)	0.54 ± 0.099	-
Bioavailability (%)	-	95.5
AUC (mg·h/L)	42.8 ± 6.53	40.9 ± 5.33
AUC (mg·h/L) of metabolites		
NAc-SMC	0.57 ± 0.21	0.49 ± 0.16
NAc-SMCS	n.d.	n.d.

Data represent mean \pm S.D. of three dogs.

^aA single oral or i.v. dose (2 mg/kg) of SMC was administered to dogs.

^bPharmacokinetic parameters were calculated from baseline-subtracted plasma concentration-time data.

^c f_{up} was determined *in vitro* by using an equilibrium dialysis device. ^dGFR, 360 mL/h/kg²⁶.

1-c 肝および腎 S9 画分による *in vitro* 代謝と種差

ラットにおける SMC と NAc-SMC の体内動態試験の結果から、ラットにおいては NAc-SMC の脱アセチル化代謝は SMC の N-アセチル化代謝よりも優位であることが示された。一方、イヌにおいても、SMC 投与後に血漿中に出現する NAc-SMC の濃度は SMC 濃度と比べて著しく低く推移することが示され、やはり、NAc-SMC の脱アセチル化代謝が SMC の N-アセチル化代謝よりも優位であることが示唆された。そこで、ラットとイヌの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験を行い、SMC の N-ア

セチル化と NAc-SMC の脱アセチル化について、それぞれの CL_{int} を算出し、両代謝活性の比較を行った。さらに、動物とヒトの間での代謝の種差を明らかにするために、ヒトの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた試験も併せて実施した。

NAc-SMC の脱アセチル化反応の $CL_{int, deacetylation}$ は NAc-SMC の消失速度から求めた。尚、予備検討により、脱アセチル化以外の代謝が起こらないことを確認した。

NAc-SMC の残存濃度の自然対数値-反応時間プロットを線形最小二乗法によって解析し、得られた $slope$ を蛋白濃度で除することで CL_{int} ($CL_{int, deacetylation}$) を算出した。この解析により、ラット S9 画分での $CL_{int, deacetylation}$ は $68 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (肝 S9 画分) と $314 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (腎 S9 画分)、イヌ S9 画分での $CL_{int, deacetylation}$ は $34 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (肝 S9 画分) と $917 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (腎 S9 画分) と算出された (Fig. 23A~23D)。また、ヒトの S9 画分による NAc-SMC の脱アセチル化反応についても同様の解析を行い、肝 S9 画分での $CL_{int, deacetylation}$ は $77 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 24A)、腎 S9 画分での $CL_{int, deacetylation}$ は $104 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 24B) と算出された。

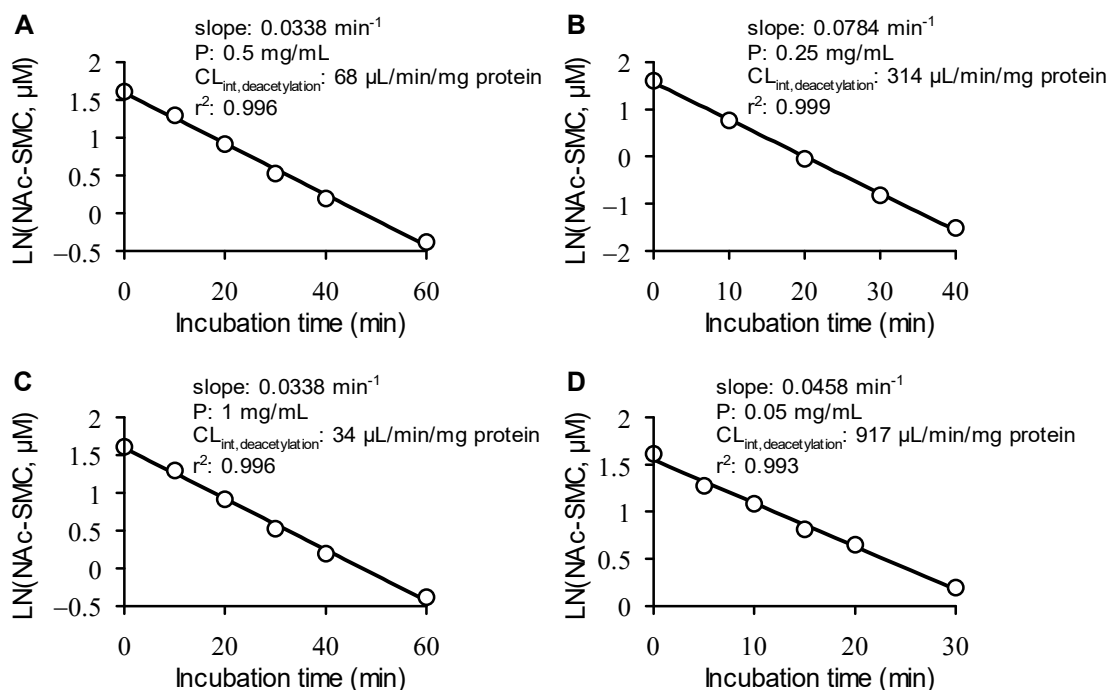


Fig. 23 Concentration of NAc-SMC remained-time plots in the incubation mixtures for NAc-SMC deacetylation by rat liver S9 fraction (A), rat kidney S9 fraction (B), dog liver S9 fraction (C), and dog kidney S9 fraction (D).

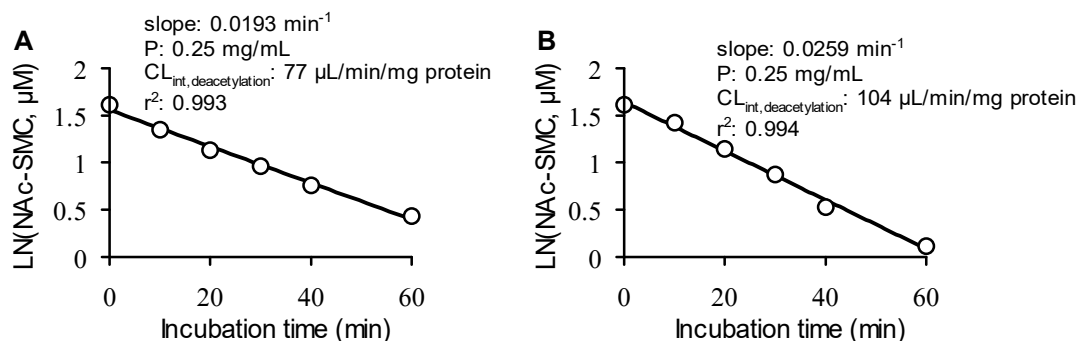


Fig. 24 Concentration of NAc-SMC remained-time plots in the incubation mixtures for NAc-SMC deacetylation by human liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

Fig. 25 には、肝臓と腎臓の S9 画分による SMC の N-アセチル化反応について、 $CL_{\text{int, acetylation}}$ を算出するために用いたプロットを示した。ラットとイヌの肝 S9 画分には SMC の N-アセチル化活性が検出されなかった。一方、ラットとイヌの腎 S9 画分による SMC の N-アセチル化反応においては、SMC の N-アセチル化速度と NAc-SMC の脱アセチル化速度が平衡に達するまで SMC の N-アセチル化反応が進行した。そこで、NAc-SMC の生成濃度を反応時間に対してプロットし、第 1 章と同様に式 6 と式 7 を用いて解析した結果、ラット腎 S9 画分での $CL_{\text{int, acetylation}}$ は $36 \text{ } \mu\text{L/min/mg protein}$ (Fig. 25A)、イヌ腎 S9 画分での $CL_{\text{int, acetylation}}$ は $5.6 \text{ } \mu\text{L/min/mg protein}$ と算出された (Fig. 25B)。また、ヒトの S9 画分による SMC の N-アセチル化反応についても同様の解析を行い、肝 S9 画分での $CL_{\text{int, acetylation}}$ は $0.74 \text{ } \mu\text{L/min/mg protein}$ (Fig. 25C)、腎 S9 画分での $CL_{\text{int, acetylation}}$ は $1.1 \text{ } \mu\text{L/min/mg protein}$ (Fig. 25D) と算出された。

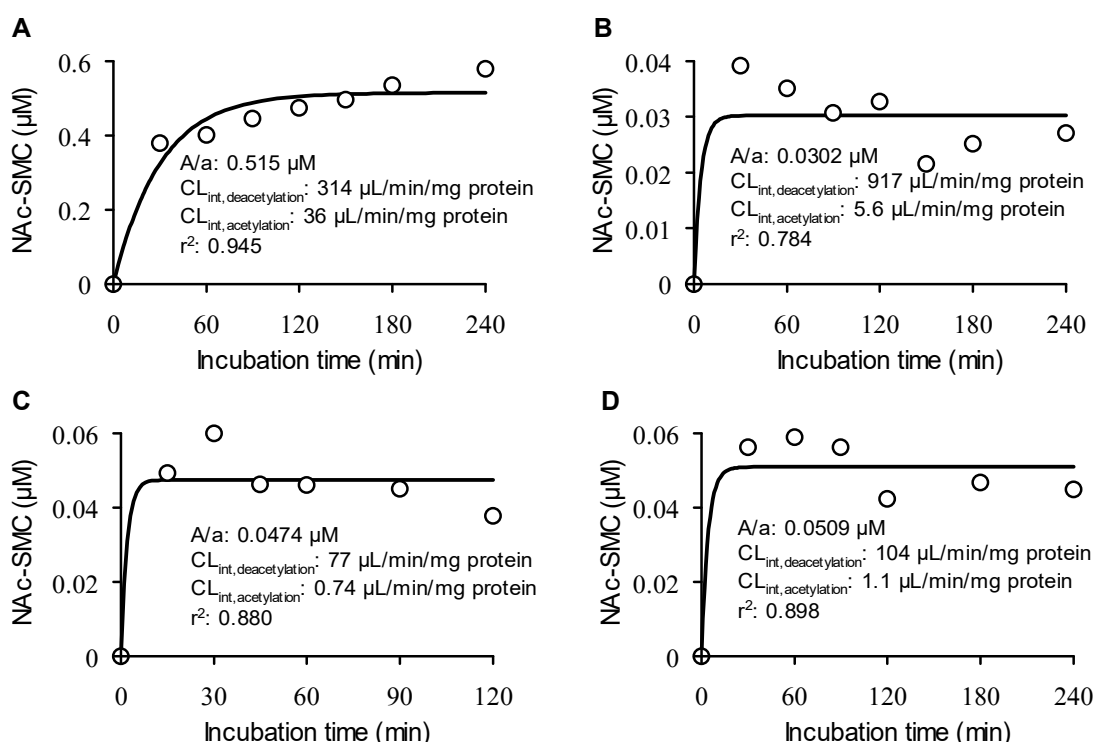


Fig. 25 Concentration of NAc-SMC formed-time plots in the incubation mixtures for SMC *N*-acetylation by rat kidney S9 fraction (A), dog kidney S9 fraction (B), human liver S9 fraction (C), and human kidney S9 fraction (D).

Table 15 には、ラット、イヌ、およびヒトの肝臓と腎臓の S9 画分による SMC の *N*-アセチル化と NAc-SMC の脱アセチル化の CL_{int} を示した。尚、 CL_{int} は S9 蛋白量当たりの値に加えて、体重 kg 当たりの値も併せて算出した。ラットの肝臓には SMC の *N*-アセチル化活性が検出されず、NAc-SMC の脱アセチル化活性のみが検出されたのに対し、腎臓の NAc-SMC の脱アセチル化活性は SMC の *N*-アセチル化活性よりも約 9 倍高いことが示された。この結果はラットにおいて、SMC 投与後の血漿中に出現する NAc-SMC の濃度が SMC 濃度と比べて著しく低いこと (Fig. 21A と 21B)、および NAc-SMC の静脈内投与後にその血漿中濃度が急激に減少し、それに応じて SMC が血漿中に出現するという *in vivo* 結果 (Fig. 21C) を裏付けるものである。また、イヌの肝臓にも NAc-SMC の脱アセチル化活性のみが検出され、腎臓の NAc-SMC の脱アセチル化活性は SMC の *N*-アセチル化活性よりも約 160 倍高いことが示された。この結果もイヌにおいて、SMC 投与後に血漿中に出現する NAc-SMC の濃度が SMC 濃度に比べて著しく低いという *in vivo* 結果 (Fig. 22A と 22B) を裏付けるものである。一方、ヒトの肝臓と腎臓の NAc-SMC の脱アセチル化活性は SMC の *N*-アセチル化活性よりも 2 オーダー高いことが示された。以上の結果から、肝臓と腎臓における SMC の *N*-アセチル化活性に対する NAc-SMC の脱アセチル化活性の優位性には種差がないことが示され、ヒトにおいても SMC から NAc-SMC が生成し難いことが推察された。

Table 15 CL_{int} values for *N*-acetylation of SMC and for deacetylation of NAc-SMC in liver and kidney S9 fractions of rat, dog, and human.

Species	S9	<i>N</i> -acetylation	Deacetylation
$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein			
Rat	Liver	n.d.	68
	Kidney	36	314
Dog	Liver	n.d.	34
	Kidney	5.6	917
Human	Liver	0.74	77
	Kidney	1.1	104
$\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$ body weight			
Rat ^{a)}	Liver ^{d)}	n.d.	327
	Kidney ^{e)}	27	235
Dog ^{b)}	Liver ^{d)}	n.d.	131
	Kidney ^{e)}	2.6	429
Human ^{c)}	Liver ^{d)}	2.3	241
	Kidney ^{e)}	0.44	43

^{a)}40 g liver/kg body weight, 8.0 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{b)}32 g liver/kg body weight, 5.0 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{c)}26 g liver/kg body weight, 4.4 g kidney/kg body weight²⁶⁾.

^{d)}121 mg S9 protein/g liver²⁷⁾. ^{e)}93.5 mg S9 protein/g kidney²⁷⁾. n.d., not detected.

1-d 考察

これまでに、動物やヒトにおける SMC の尿中代謝物が探索され、SMC は主に無機イオウ化合物として尿中へ排泄されること、加えて、尿中には N-アセチル化や S-酸化、あるいは脱アミノ化を受けた代謝物が排泄されることが報告されている²³⁻²⁵⁾。しかし、SMC の血中動態に関する研究報告はなく、SMC とその代謝物の血中動態は不明のままであった。本節では SAC の研究で得られた知見にもとづき、SMC の体内動態とその N-アセチル化代謝を明らかにすることを目的として、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。SMC の血中濃度は持続するという予備検討結果から、ラットとイヌにおける SMC と N-アセチル化代謝物 (NAc-SMC と NAc-SMCS) の投与量は 2 mg/kg に設定した。

本研究において、ラットとイヌの血中や尿中に内因性の SMC、NAc-SMC、および NAc-SMCS が存在することが示された。ヒトの血中や尿中にも SMC が検出されており^{53,54)}、その由来は不明であるが、DNA 修復酵素である O-6-methylguanine-DNA methyltransferase の異化産物として生成することが想定されている。

SMC は経口吸収性に優れ、ラットとイヌでの bioavailability はそれぞれ、95.8%と 95.5%であった。これまでに報告されているように^{23,24)}、ラットの尿中には SMC は未変化体としてほとんど排泄されず、N-アセチル化や S-酸化を受けた代謝物 (NAc-SMC と NAc-SMCS) が排泄された。SMC の静脈内投与後、

SMC、NAc-SMC、および NAc-SMCS の尿中排泄率はそれぞれ、SMC 投与量の 1.8%、13%、および 10%であり、3 化合物の総尿中排泄率は投与量の 25%であった (Table 11)。Barnsley²³⁾は、ラットにおいて SMC 投与量の約 50%が無機イオウ化合物として尿中に排泄されること、および尿中には本研究でも確認された NAc-SMC や NAc-SMCS に加えて、SMC sulfoxide や脱アミノ化を受けた 3-methylthiopyruvic acid や 3-methylthiolactic acid も排泄されることを報告している。本研究においては、SMC sulfoxide の検討を行えなかったが、ラットの肝臓や腎臓に存在する flavin-containing monooxygenase が SMC の S-酸化を担う可能性が示されている⁵⁵⁾。また、無機イオウ化合物の生成経路に関しては、SMC の C-S 結合が開裂された後、sulphate や carbon dioxide、あるいは urea へと代謝される経路が推定されている²⁵⁾。ただし、ラットの肝臓や腎臓に存在する C-S 結合開裂酵素は SMC を基質としないことが報告されており²⁸⁾、SMC から無機イオウ化合物への代謝を担う酵素には不明の部分が多い。一方、イヌにおける SMC の代謝や排泄に関する研究は実施されてこなかった。本研究において、イヌにおいても SMC はほとんど尿中に排泄されず、その CL_r (0.086 mL/h/kg) は CL_{tot} (48 mL/h/kg) の約 0.18%であることが示され、ラットの場合と同様に、イヌにおいても SMC の血漿中からの消失は主に代謝に依存することが示唆された。

さらに、本研究において、SAC の場合とは異なり、SMC は N-アセチル化代謝を受け難いことが示された。ラットとイヌにおける SMC の血中動態試験の結果から、SMC から NAc-SMC が生成し難いことが示され (Fig. 21A, B, Fig. 22 A, B)、このことは *in vitro* 代謝試験の結果によって裏付けられた。即ち、ラットやイヌの肝臓には SMC の N-アセチル化活性が検出されず、腎臓の NAc-SMC の脱アセチル化活性は SMC の N-アセチル化活性に比べて、ラットでは約 9 倍、イヌでは約 160 倍も高いことが示された (Table 15)。また、肝臓には SMC の N-アセチル化活性が検出されなかったことから、SMC 投与後の血中に出現する NAc-SMC は腎臓で生成したものに由来することが強く示唆された。

SAC の場合と同様に、SMC とその N-アセチル化代謝物 (NAc-SMC) の腎排泄様式は異なることが示唆された。ラットとイヌにおける SMC の CL_r (5.9 mL/h/kg と 0.086 mL/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (ラット 290 mL/h/kg、イヌ 330 mL/h/kg) に比べて極めて小さな値であることが示され (Table 12 と Table 14)、SAC と同様に、SMC は腎尿細管から再吸収されることが示唆された。SAC の腎排泄について考察されたように、アミノ酸や cysteine-S-conjugate は腎尿細管に存在する各種トランスポーターを介して再吸収されることが知られており³¹⁻³³⁾、SMC もこれらのトランスポーターを介して再吸収されるものと考えられた。NAc-SMC と NAc-SMCS の腎排泄様式に関しては、ラットにおいて知見が得られた。NAc-SMC 投与後に得られた NAc-SMC の CL_r (0.14 L/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (0.22 L/h/kg) との間に大きな差を認めなかった。しかし、上述したように、ラットの腎臓は NAc-SMC の脱アセチル化が優位であり (Table 15)、NAc-SMC が腎排泄過程で SMC へ代謝された場

合、血中濃度を基準として算出する NAc-SMC の CL_r が過少評価されることになる。実際、SMC 投与後に得られた NAc-SMC の CL_r (3.4 L/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (0.22 L/h/kg) を大きく上回ることが示され (Table 12)、NAc-SMC が尿中へ分泌されており、NAc-SMC 投与後に得られた NAc-SMC の CL_r が過少評価されている可能性が示された。また、NAc-SMCS の CL_r (0.45 L/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (0.22 L/h/kg) よりも約 2 倍大きく、NAc-SMCS も尿中へ分泌されることが示唆された。NAc-SMC の類縁体である NAc-SAC は Renal Organic Anion Transporter 1 を介して尿中に排泄される可能性が示されており³⁴⁾、NAc-SMC と NAc-SMCS も本輸送系を介して尿中に分泌されることが推測された。一方、イヌにおいては NAc-SMC が尿中に排泄されず、腎排泄様式の解析には至らなかったが、イヌの腎臓は強力な NAc-SMC の脱アセチル化活性を有することが示された (Table 15)。このことから、NAc-SMC は腎排泄過程でそのほとんどが SMC へ代謝された後、糸球体ろ過された SMC と一緒に再吸収されているものと考えられた。

さらに、血中動態と腎クリアランスの解析結果から、ラットにおける SMC から NAc-SMCS の生成に関する知見が得られた。まず、ラットへの NAc-SMC の静脈内投与後の血中に NAc-SMCS が出現し (Fig. 21C)、NAc-SMC 投与量の 10% が NAc-SMCS として尿中に排泄された (Table 11)。加えて、NAc-SMC 投与後に得られた NAc-SMCS の CL_r (9.2 L/h/kg) は NAc-SMCS 投与後に得られた NAc-SMCS の CL_r (0.45 L/h/kg) よりも極めて大きな値であることが示された (Table 12)。このことから、NAc-SMC 投与後に得られた NAc-SMCS の CL_r には、腎臓内で NAc-SMC が S-酸化を受け、生成した NAc-SMCS がそのまま尿中へ分泌されたものが加味されていることが示唆された。このことは、NAc-SMC 投与後に得られた NAc-SMCS の CL_r (9.2 L/h/kg) がラットの腎血流量 (2.2 L/h/kg²⁶⁾) よりも著しく大きな値であることから明らかであり、NAc-SMC 投与後に得られた NAc-SMCS の CL_r が過大評価されていると考えられた。

本節において、SMC のラットとイヌにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態について検討した。SAC と同様に、SMC は経口吸収性に優れ、腎尿細管での再吸収を介して全身を再循環すると考えられ、特にイヌにおいては血中濃度が持続する ($t_{1/2}$, 8.0~8.9 h) ことが示された。また、SMC の主な消失経路は代謝であることが確認されたが、SAC とは異なり、N-アセチル化代謝を受け難く、SMC から NAc-SMC や NAc-SMCS の生成は起こり難いことが明らかとなった。このことは、cysteine-S-conjugate の N-アセチル化を担う N-acetyltransferase は脂溶性の高い基質を好むという報告と整合するものであった⁴¹⁾。さらに、*in vitro* 代謝試験と腎クリアランス解析の結果から、SMC が N-アセチル化代謝を受け難い理由は肝臓や腎臓における NAc-SMC の脱アセチル化代謝が SMC のアセチル化代謝に比べて優位であること、加えて、SMC の N-アセチル化は腎臓で起こることが示唆された。

第2節 SIPCのN-アセチル化代謝、排泄、および血中動態

AGEの代表的な水溶性イオウ化合物の一つであるSIPCはその構造がSACの構造と極めて類似している。これまでに、SIPCの生物活性や薬理作用に関する研究報告はほとんどないが、最近、免疫系への作用が報告され¹⁶⁾、SIPCがAGEの薬効成分である可能性が示されている。同様に、SIPCの体内動態に関しても全く研究されてこなかったが、SIPCの薬理作用を考える上で、その動態特性を明らかにすることは必要不可欠と思われる。また、SACの体内動態との比較にも興味を持たれる。

本節ではラットとイヌにおけるSIPCの体内動態とそのN-アセチル化代謝を明らかにすることを目的として、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。なお、*in vivo* 試験に用いた投与量はSACの場合と同様に、ラットでは5 mg/kg、イヌでは2 mg/kgに設定した。この5 mg/kgと2 mg/kgという用量は、AGE1日服用量に含まれるSIPC量(0.6~1.2 mg)から換算した投与量(体重を70 kgとした)と比べて、それぞれ300~600倍、120~240倍高い値である。

2-a ラットにおけるN-アセチル化代謝、排泄、および血中動態

ラットにおけるSIPCのN-アセチル化代謝、排泄、および血中動態を明らかにする目的で、SIPC、*trans*-N-acetyl-S-1-propenyl-L-cysteine (NAc-SIPC)、あるいは *trans*-N-acetyl-S-1-propenyl-L-cysteine sulfoxide (NAc-SIPCS)の投与後、未変化体(SIPC)とN-アセチル化代謝物(NAc-SIPCとNAc-SIPCS)の尿・胆汁中排泄と血中動態の解析・評価を行った。尚、尿・胆汁中排泄と血中動態の試験は別々に実施した。

SIPC、NAc-SIPC、NAc-SIPCSの5 mg/kgをラットに経口、あるいは静脈内投与した後、尿と胆汁を24時間採取し、尿・胆汁中に排泄されたSIPC、NAc-SIPC、およびNAc-SIPCSをLC-MS/MSにて測定した。尚、尿は無処置ラットから、胆汁は胆管にカニキュレーションを施したラットから、別々に採取した。

Table 16 には、SIPC、NAc-SIPC、NAc-SIPCSの投与後のSIPCとそのN-アセチル化代謝物(NAc-SIPCとNAc-SIPCS)の尿・胆汁中排泄率(%、投与量に対する割合)を示す。まず、SIPCの投与後、SIPCとN-アセチル化代謝物は胆汁中にほとんど排泄されなかった。SACの場合と同様に、SIPCは未変化体としてはほとんど排泄されず、SIPC投与量の大部分はそのN-アセチル化代謝物(NAc-SIPCとNAc-SIPCS)として尿中に排泄された。SIPCの静脈内投与後、SIPC、NAc-SIPC、およびNAc-SIPCSの尿中排泄率はそれぞれ、投与量の2.2%、73%、および13%であり、NAc-SIPCとNAc-SIPCSの尿中排泄率の合計は投与量の約86%であることが示された。このことから、SACと同様に、SIPCの主要な消失経路はN-アセチル化代謝であることが明らかとなった。また、経口投与後にお

いても、S1PCとN-アセチル化代謝物ともに静脈内投与後とほぼ同等の排泄率が得られ、S1PCの経口吸収性は優れていることが示唆された。

NAc-S1PCの静脈内投与後、S1PC、NAc-S1PC、およびNAc-S1PCSの尿中排泄率はそれぞれ、投与量の4.2%、69%、および10%であり、S1PCの静脈内投与後に得られた排泄率と同程度の値となった。また、NAc-S1PC投与後にS1PCとNAc-S1PCSが尿中に排泄されたことから、NAc-SACと同様に、NAc-S1PCは脱アセチル化とS-酸化を受けることが示唆された。一方、静脈内投与されたNAc-S1PCS量の97%が未変化体として尿中へ排泄されたことから、NAc-SACSと同様に、NAc-S1PCSは代謝的に安定であることが示された。

Table 16 Urinary and biliary excretion of S1PC, NAc-S1PC, and NAc-S1PCS in rats after oral and i.v. administration.

Compound ^a	Excreta		Excretion (% of Dose) ^b			
			S1PC	NAc-S1PC	NAc-S1PCS	Total
S1PC	urine	i.v.	2.2 ± 0.42	73 ± 2.8	13 ± 1.1	88 ± 2.2
		oral	3.1 ± 1.5	69 ± 1.4	15 ± 1.2	87 ± 1.2
	bile	i.v.	0.35 ± 0.15	0.26 ± 0.18	0.01 ± 0.01	0.62 ± 0.34
		oral	0.10 ± 0.04	0.22 ± 0.06	0.02 ± 0.004	0.34 ± 0.09
NAc-S1PC	urine	i.v.	4.2 ± 2.9	69 ± 7.1	10 ± 2.4	84 ± 2.0
	bile	i.v.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
NAc-S1PCS	urine	i.v.	n.d.	n.d.	97 ± 0.49	97 ± 0.49
	bile	i.v.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Data represent mean ± SD of three rats. n.d., not detected. n.e., not examined.

^aA single oral or i.v. dose (5 mg/kg) of S1PC, NAc-S1PC, and NAc-S1PCS was administered to intact and bile duct-cannulated rats.

^bAmount (% of dose, on a molar basis) of S1PC, NAc-S1PC, and NAc-S1PCS excreted in urine and bile for 24 h postdose.

次に、S1PCとN-アセチル化代謝物 (NAc-S1PCとNAc-S1PCS) の血中動態を解析した。S1PC、NAc-S1PC、NAc-S1PCSの5 mg/kgをラットに経口、あるいは静脈内投与した後、血液を経時的に採取し、S1PC、NAc-S1PC、およびNAc-S1PCSの血漿中濃度をLC-MS/MSにて測定した。

S1PC投与後、血漿中に出現した未変化体 (S1PC) と N-アセチル化代謝物 (NAc-S1PC と NAc-S1PCS) の濃度推移を Fig. 26A (経口投与) と Fig. 26B (静脈内投与) に示す。S1PCは未変化体としてはほとんど排泄されなかったが、その血漿中濃度は NAc-S1PC や NAc-S1PCS の濃度よりも高く、S1PC と N-アセチル化代謝物の濃度は S1PC > NAc-S1PC >> NAc-S1PCS の順で推移した。また、NAc-S1PCの投与後にS1PCとNAc-S1PCSが尿中に排泄された結果と整合して、NAc-S1PCの静脈内投与後、S1PCとNAc-S1PCSが血漿中に検出された (Fig. 26C)。これらの結果から、SACの場合と同様に、ラットにおいてS1PCのN-アセチル化に加えて、NAc-S1PCの脱アセチル化が起こること、お

よび S1PC から NAc-S1PCS の生成は NAc-S1PC の S-酸化を経由することが示唆された。尚、本研究では S1PC sulfoxide の標品を合成できなかったため、NAc-S1PCS の静脈内投与後、NAc-S1PCS が脱アセチル化を受け、血中に S1PC sulfoxide が出現するか否かについて検討できなかった (Fig. 26D)。

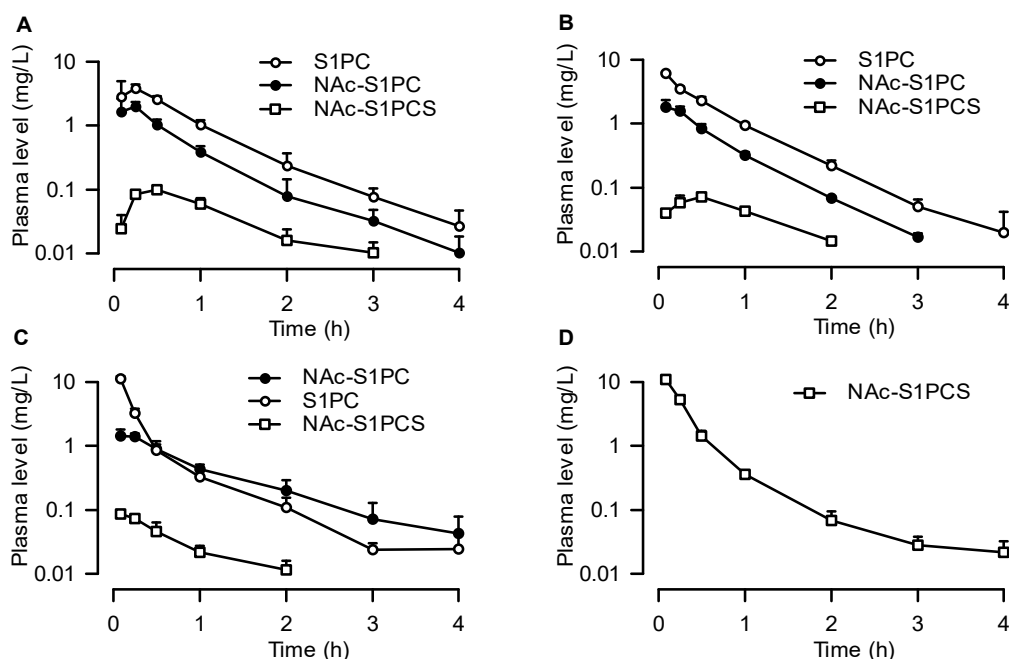


Fig. 26 Plasma concentration-time profiles of S1PC, NAc-S1PC, and NAc-S1PCS in rats after administration of a single dose (5 mg/kg) of S1PC (A, oral; B, i.v.), NAc-S1PC (C, i.v.) and NAc-S1PCS (D, i.v.). Each point represents mean \pm S.D. of three to four rats.

Table 17 には、S1PC、NAc-S1PC、および NAc-S1PCS の主要な体内動態パラメータを示す。S1PC は良好な経口吸収性を有し、その bioavailability は 88.0%であった。また、 $t_{1/2}$ 、 CL_{tot} 、および Vd_{ss} はそれぞれ、0.52~0.56 h、1.4 L/h/kg、および 0.77 L/kg であった。 CL_r (0.030 L/h/kg) は CL_{tot} の約 2.2%に過ぎず、SAC や SMC と同様に、S1PC の血中からの消失のほとんどが代謝に依存していることが示された。まず、S1PCとその代謝物である NAc-S1PC、NAc-S1PCS の Vd_{ss} はそれぞれ、0.77、0.41、0.33 L/kg であった。SMCとそのN-アセチル化代謝物の場合に考察したように、S1PC のN-アセチル化代謝物である NAc-S1PC や NAc-S1PCS は S1PC と比べて水溶性が高いと考えられ、加えて、血漿蛋白との結合性も高いため (f_{up} ; S1PC 0.77, NAc-S1PC 0.74, NAc-S1PCS 0.56)、S1PC と比べて組織へ移行性が低く、 Vd_{ss} がより小さな値になったと思われる。

Table 17. Pharmacokinetic parameters of S1PC, NAc-S1PC, and NAc-S1PCS in rats after oral and i.v. administration

Parameters	S1PC ^a		NAc-S1PC ^a	NAc-S1PCS ^a
	i.v.	oral	i.v.	i.v.
C ₀ or C _{max} (mg/L)	7.9 ± 0.79	4.2 ± 0.92	21 ± 1.3	17 ± 5.2
t _{max} (h)	-	0.19 ± 0.096	-	-
t _{1/2} (h) at terminal	0.52 ± 0.10	0.56 ± 0.072	0.62 ± 0.17	0.56 ± 0.10
CL _{tot} (L/h/kg)	1.4 ± 0.078	-	1.4 ± 0.13	1.0 ± 0.21
CL _r (L/h/kg)	0.030	0.047	0.96	1.0
f _{up} ^b		0.77	0.74	0.56
GFR ^c × f _{up} ^b (L/h/kg)		0.23	0.22	0.17
MRT (h)	0.56 ± 0.069	0.72 ± 0.14	0.30 ± 0.065	0.32 ± 0.031
Vd _{ss} (L/kg)	0.77 ± 0.051	-	0.41 ± 0.11	0.33 ± 0.049
Bioavailability (%)	-	88.0	-	-
AUC (mg·h/L)	3.66 ± 0.21	3.22 ± 0.34	3.63 ± 0.36	4.97 ± 1.10
MRT (h) of metabolites				
S1PC	-	-	0.97 ± 0.32	-
NAc-S1PC	0.60 ± 0.046	-	-	-
NAc-S1PCS	n.c.	-	n.c.	-
AUC (mg·h/L) of metabolites				
S1PC	-	-	1.46 ± 0.21	n.d.
NAc-S1PC	1.14 ± 0.15	1.42 ± 0.14	-	n.d.
NAc-S1PCS	0.10 ± 0.007	0.13 ± 0.024	0.075 ± 0.010	-
CL _r (L/h/kg) of metabolites				
S1PC	-	-	0.11	-
NAc-S1PC	4.0	3.1	-	-
NAc-S1PCS	9.1	7.5	7.4	-

Data represent mean ± S.D. of three to four rats. n.d., not detected. n.c., not calculated.

^aA single oral of i.v. dose (5 mg/kg) of S1PC, NAc-S1PC, and NAc-S1PCS was administered to rats.

^bf_{up} was determined in vitro by using an equilibrium dialysis device. ^cGFR, 0.3 L/h/kg²⁶⁾.

SACやSMCの場合と同様に、未変化体(S1PC)とN-アセチル化代謝物(NAc-S1PCとNAc-S1PCS)の腎排泄様式を調べるために、腎クリアランスの解析を行った。S1PCの糸球体ろ過に依存した腎クリアランスを見積もると、0.23 L/h/kg (GFR × f_{up} = 約 0.3 L/h/kg²⁶⁾ × 0.77) という値が得られ、S1PC投与後に得られたS1PCのCL_r (0.030 L/h/kg)は糸球体ろ過に依存した腎クリアランスの約13%であることが示された。このことから、SACやSMCと同様に、S1PCは腎尿管で再吸収されることが示唆された。さらに、NAc-S1PCとNAc-S1PCSについても糸球体ろ過に依存した腎クリアランス(GFR × f_{up})を見積もり、それぞれのCL_rと比較した。その結果、NAc-S1PC、NAc-S1PCSの投与後に得られたNAc-S1PC、NAc-S1PCSのCL_r (0.96 L/h/kgと1.0 L/h/kg)は、それぞれの糸球体ろ過に依存した腎クリアランス(0.22 L/h/kgと0.17 L/h/kg)に比べて大きな値であることが示され、S1PCのN-アセチル化代謝物は尿中へ能動的に分泌されることが示唆された。一方で、S1PC投与後に得られた尿中排泄率(Table 16)とAUC

(Table 17)の値を用いて算出した S1PC 投与後の NAc-S1PC の CL_r (4.0 L/h/kg) は NAc-S1PC 投与後に得られた値 (0.96 L/h/kg) よりも約 4 倍も大きくなることが示された。SAC の場合に考察されたように、腎臓内で S1PC から NAc-S1PC が生成し、そのまま尿中に排泄された場合、血漿中濃度を基準として算出される NAc-S1PC の CL_r は過大評価されることになる。このことは、腎 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験を行うことで明らかになると思われる。

以上の結果から、経口吸収性に優れること、N-アセチル化代謝が主要な消失経路であること、および未変化体 (S1PC) と N-アセチル化代謝物 (NAc-S1PC と NAc-S1PCS) の腎排泄様式 (再吸収と分泌) が異なること等、S1PC と SAC のラットにおける体内動態は極めて類似していることが明らかとなった。

2-b イヌにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態

イヌにおける S1PC の N-アセチル化代謝、尿中排泄、および血中動態を明らかにすることを目的に、試験を行った。S1PC の 2 mg/kg をイヌに経口、あるいは静脈内投与した後、血液を経時的に採取した。また、投与 48 時間後までの尿も併せて採取した。S1PC、NAc-S1PC、および NAc-S1PCS の血漿中と尿中の濃度を LC-MS/MS にて測定した。

S1PC 投与後に血漿中に出現した未変化体 (S1PC) と N-アセチル化代謝物 (NAc-S1PC と NAc-S1PCS) の濃度推移を Fig. 27A (経口投与) と Fig. 27B (静脈内投与) に示す。ラットの場合と同様に、S1PC の血漿中濃度は NAc-S1PC や NAc-S1PCS の濃度よりも高く、S1PC と N-アセチル化代謝物の濃度は S1PC > NAc-S1PC >> NAc-S1PCS の順で推移した。この結果から、イヌにおいても NAc-S1PC が S1PC の主要代謝物であることが示され、S1PC と N-アセチル化代謝物の血漿中濃度推移における大小関係は、イヌとラットにおいて類似していることが明らかとなった。

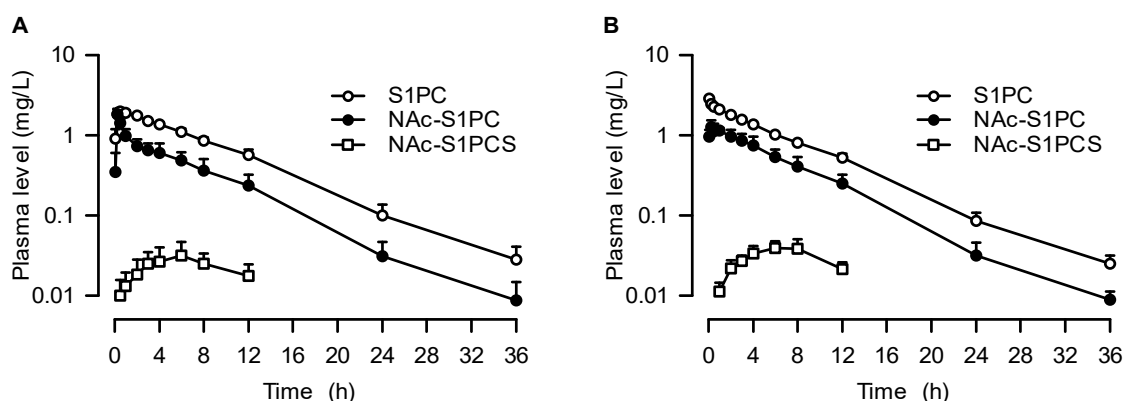


Fig. 27 Plasma concentration-time profiles of S1PC, NAc-S1PC, and NAc-S1PCS in dogs after administration of a single dose (2 mg/kg) of S1PC (A, oral; B, i.v.). Each point represents mean \pm S.D. of three dogs.

Table 18 には、S1PC の経口、あるいは静脈内投与後の未変化体(S1PC)と N-アセチル化代謝物(NAc-S1PC と NAc-S1PCS)の尿中排泄率(%、投与量に対する割合)を示す。尚、比較のために、ラットでの尿中排泄データを併せて示している。SAC の場合と同様に、未変化体(S1PC)と N-アセチル化代謝物(NAc-S1PC)はイヌの尿中にほとんど排泄されなかった。静脈内投与後に尿中に排泄された S1PC、NAc-S1PC、および NAc-S1PCS の量はそれぞれ、S1PC 投与量の 0.21%、0.86%、および 2.3% であり、経口投与後においても静脈内投与後とほぼ同等の排泄率が得られた。

Table 18. Urinary excretion of S1PC, NAc-S1PC, and NAc-S1PCS in dogs and rats after oral and i.v. administration of S1PC^a.

Species		Excretion (% of dose) ^b			
		S1PC	NAc-S1PC	NAc-S1PCS	Total
Dog	i.v.	0.21 ± 0.06	0.86 ± 0.44	2.3 ± 1.2	3.4 ± 1.7
	oral	0.22 ± 0.14	0.62 ± 0.34	3.3 ± 2.4	4.2 ± 2.7
Rat	i.v.	2.2 ± 0.42	73 ± 2.8	13 ± 1.1	88 ± 2.2
	oral	3.1 ± 1.5	69 ± 1.4	15 ± 1.2	87 ± 1.2

Data represent mean ± S.D. of three animals.

^aA single oral or i.v. dose of S1PC was administered to dogs (2 mg/kg) and rats (5 mg/kg).

^bAmount (% of dose, on a molar basis) of S1PC, NAc-S1PC, and NAc-S1PCS excreted in urine of dogs for 48 h postdose and rats for 24 h postdose.

Table 19 には、S1PC の主要な動態パラメータを示す。S1PC の bioavailability はほぼ 100%であり、消化管からは完全に吸収されているものと考えられた。S1PC の CL_{tot} (110 mL/h/kg) は小さく、その血漿中濃度は持続し、 $t_{1/2}$ は 5.3~5.6 h であった。また、 CL_r (0.23 mL/h/kg) は CL_{tot} の約 0.2%に過ぎず、S1PC の主な消失経路は代謝、あるいは胆汁排泄であることが示された。

Table 19 Pharmacokinetic parameters of S1PC in dogs after oral and i.v. administration^a.

Parameters	i.v.	oral
C ₀ or C _{max} (mg/L)	3.1 ± 0.14	2.0 ± 0.22
t _{max} (h)	-	0.42 ± 0.14
t _{1/2} (h) at terminal	5.3 ± 0.38	5.6 ± 0.58
CL _{tot} (mL/h/kg)	110 ± 4.6	-
CL _r (mL/h/kg)	0.23 ± 0.070	0.24 ± 0.17
f _{up} ^b		0.75
GFR ^c × f _{up} ^b (mL/h/kg)		270
MRT (h)	7.3 ± 0.57	8.0 ± 0.73
Vd _{ss} (L/kg)	0.78 ± 0.027	-
Bioavailability (%)	-	100
AUC (mg h/L)	18.7 ± 0.83	18.8 ± 2.38
MRT (h) of metabolites		
NAc-S1PC	6.6 ± 0.78	-
NAc-S1PCS	n.c.	n.c.
AUC (mg h/L) of metabolites		
NAc-S1PC	9.29 ± 1.91	8.37 ± 2.50
NAc-S1PCS	0.54 ± 0.11	0.45 ± 0.17
CL _r (mL/h/kg) of metabolites		
NAc-S1PC	2.4 ± 1.2	2.0 ± 1.1
NAc-S1PCS	120 ± 56	180 ± 60

Data represent mean ± S.D. of three dogs. n.c., not calculated.

^aA single oral or i.v. dose (2 mg/kg) of S1PC was administered to dogs.

^bf_{up} was determined in vitro by using an equilibrium dialysis device. ^cGFR, 360 mL/h/kg²⁶.

さらに、S1PC の糸球体ろ過に依存した腎クリアランスを見積もると、270 mL/h/kg (GFR × f_{up} = 約 360 mL/h/kg²⁶ × 0.75) という値が得られた。このことから、S1PC の CL_r (0.23 mL/h/kg) は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (270 mL/h/kg) の約 0.08% であることが示され、イヌにおいても S1PC は腎尿細管で再吸収されることが示唆された。また、S1PC 投与後の尿中排泄率 (Table 18) と AUC 値 (Table 19) を用いて N-アセチル化代謝物 (NAc-S1PC と NAc-S1PCS) の CL_r を算出し、それぞれの糸球体ろ過に依存した腎クリアランスとの比較を行った。その結果、NAc-S1PC の CL_r (2.4 mL/h/kg) は、糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (250 mL/h/kg, GFR × f_{up} = 約 360 mL/h/kg²⁶ × 0.70) の約 0.95% となることが示され、イヌにおいては腎尿細管から再吸収される可能性が示された。また、NAc-S1PCS の CL_r (120 mL/h/kg) は、糸球体ろ過に依存した腎クリアランス (190 mL/h/kg, GFR × f_{up} = 約 360 mL/h/kg²⁶ × 0.53) と同程度の値となった。以上の腎クリアランスの解析結果からは、ラットの場合とは異なり、NAc-S1PC と NAc-S1PCS が尿中へ分泌されていることを示唆する結果は得られなかった。しかし、SAC の場合に示唆されたように、腎排泄過程で NAc-S1PC と NAc-S1PCS が脱アセチル化を受けた場合、血漿中濃度

を基準として算出される NAc-SIPC と NAc-SIPCS の CL_r は過少評価されることになる。この可能性については、SAC の場合と同様に、*in vitro* 代謝試験を行うことで、検証できると考えられる。

以上の血中動態と尿中排泄の試験結果から、SIPC は経口吸収性に優れ、腎臓で再吸収されること、血中濃度が持続すること、未変化体 (SIPC) の血漿中濃度は N-アセチル化代謝物 (NAc-SIPC と NAc-SIPCS) の濃度よりも高く推移すること、および主要な N-アセチル化代謝物 (NAc-SIPC) が尿中へほとんど排泄されないことが示され、SIPC と SAC の体内動態はイヌにおいても極めて類似していることが明らかとなった。

2-c 肝および腎 S9 画分による *in vitro* 代謝と種差

ラットにおける SIPC と NAc-SIPC の体内動態試験の結果から、ラットにおいては SIPC の N-アセチル化と NAc-SIPC の脱アセチル化が起こることが示された。一方、イヌにおいても NAc-SIPC が主要な血中代謝物であり、SIPC の N-アセチル化が起こることが示された。さらに、イヌにおいては NAc-SIPC が尿中へほとんど排泄されないことが示され、NAc-SAC の場合に示唆されたように、NAc-SIPC が腎排泄過程でそのほとんどが SIPC へ代謝されている可能性が示された。そこで、ラットとイヌの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験を行い、SIPC の N-アセチル化と NAc-SIPC の脱アセチル化について、それぞれの CL_{int} を算出し、両代謝活性を比較した。さらに、動物とヒトの間での代謝の種差を明らかにするために、ヒトの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた試験も併せて実施した。

NAc-SIPC の脱アセチル化反応の $CL_{int, deacetylation}$ は NAc-SIPC の消失速度から求めた。尚、予備検討により、脱アセチル化以外の代謝が起こらないことを確認した。

NAc-SIPC の残存濃度の自然対数値-反応時間プロットを線形最小二乗法によって解析し、得られた *slope* を蛋白濃度で除することで CL_{int} ($CL_{int, deacetylation}$) を算出した。この解析により、ラット S9 画分での $CL_{int, deacetylation}$ は 15 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (肝 S9 画分) と 74 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (腎 S9 画分)、イヌ S9 画分での $CL_{int, deacetylation}$ は 1.3 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (肝 S9 画分) と 1336 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (腎 S9 画分) と算出された (Fig. 28A~28D)。また、ヒトの S9 画分による NAc-SIPC の脱アセチル化反応についても同様の解析を行い、肝 S9 画分での $CL_{int, deacetylation}$ は 70 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 29A)、腎 S9 画分での $CL_{int, deacetylation}$ は 172 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 29B) と算出された。

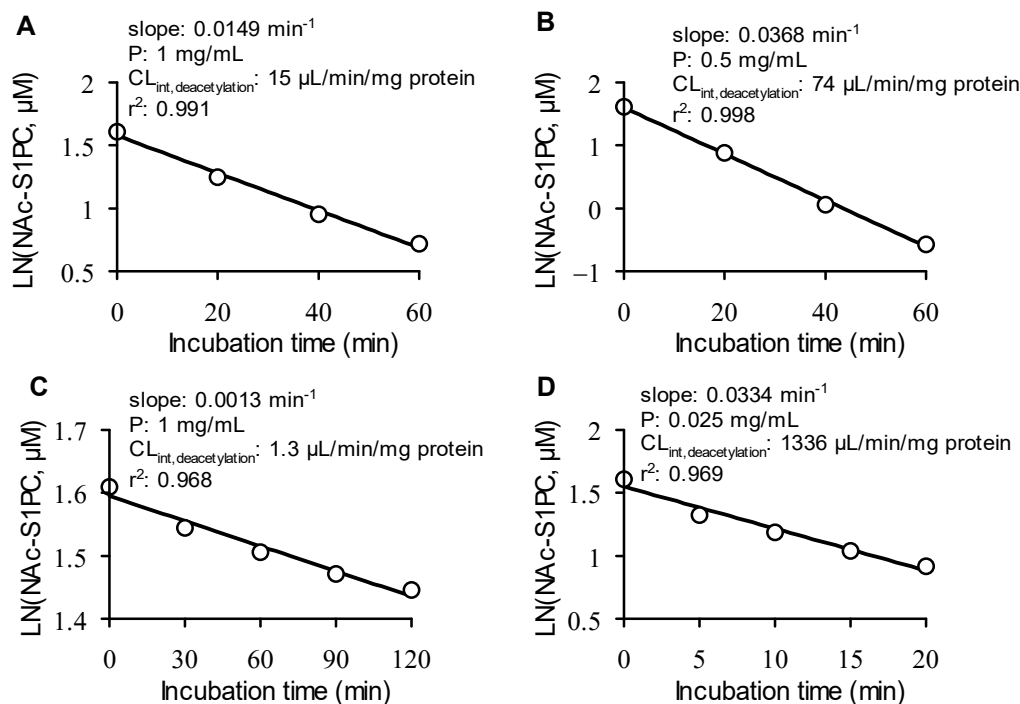


Fig. 28 Concentration of NAc-S1PC remained-time plots in the incubation mixtures for NAc-S1PC deacetylation by rat liver S9 fraction (A), rat kidney S9 fraction (B), dog liver S9 fraction (C), and dog kidney S9 fraction (D).

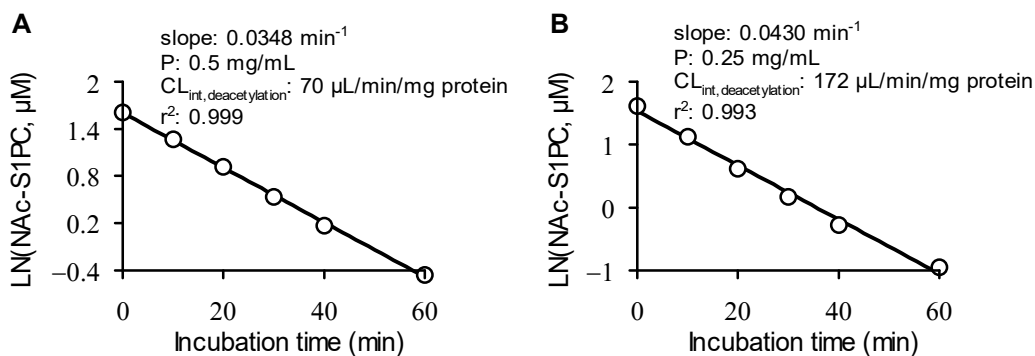


Fig. 29 Concentration of NAc-S1PC remained-time plots in the incubation mixtures for NAc-S1PC deacetylation by human liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

Fig. 30~Fig. 32 には、肝臓と腎臓の S9 画分による S1PC の N-アセチル化反応について、 $CL_{\text{int, acetylation}}$ を算出するために用いたプロットを示した。イヌの肝 S9 画分による N-アセチル化反応では、S1PC の N-アセチル化速度と NAc-S1PC の脱アセチル化速度が平衡に達するまで S1PC の N-アセチル化が進行しなかった。そこで、S1PC の消失速度から $CL_{\text{int, acetylation}}$ を算出した。S1PC の残存濃度の自然対数値-反応時間プロットを線形最小二乗法によって解析し、得られた解析結果から、イヌ肝 S9 画分での $CL_{\text{int, acetylation}}$ は $1.3 \text{ }\mu\text{L/min/mg protein}$ と算出された (Fig. 30)。

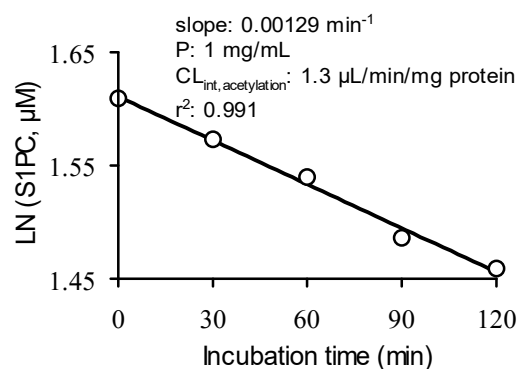


Fig. 30 Concentration of S1PC remained-time plot in the incubation mixtures for S1PC *N*-acetylation by dog liver S9 fraction.

一方、ラットの肝臓と腎臓の S9 画分、およびイヌの腎 S9 画分による S1PC の N-アセチル化反応では、S1PC の N-アセチル化と NAc-S1PC の脱アセチル化の速度が平衡に達するまで S1PC の N-アセチル化が進行した。そこで、NAc-S1PC の生成濃度を反応時間に対してプロットし、第 1 章と同様に式 6 と式 7 を用いて解析した結果、ラット肝 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は $82 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 31A)、ラット腎 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は $422 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 31B)、イヌ腎 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は $3.6 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 31C) と算出された。また、ヒトの S9 画分による S1PC の N-アセチル化反応についても同様の解析を行い、肝 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は $8.3 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 32A)、腎 S9 画分での $CL_{int,acetylation}$ は $61 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Fig. 32B) と算出された。

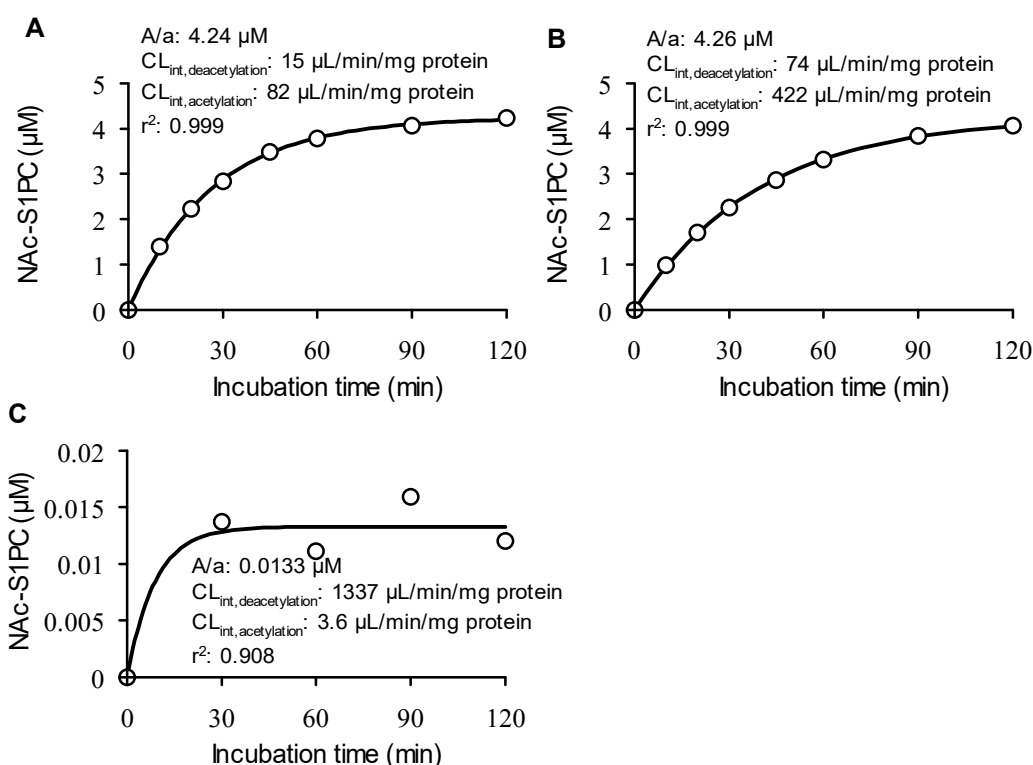


Fig. 31 Concentration of NAc-S1PC formed-time plots in the incubation mixtures for S1PC N-acetylation by rat liver S9 fraction (A), rat kidney S9 fraction (B), and dog kidney S9 fraction (C).

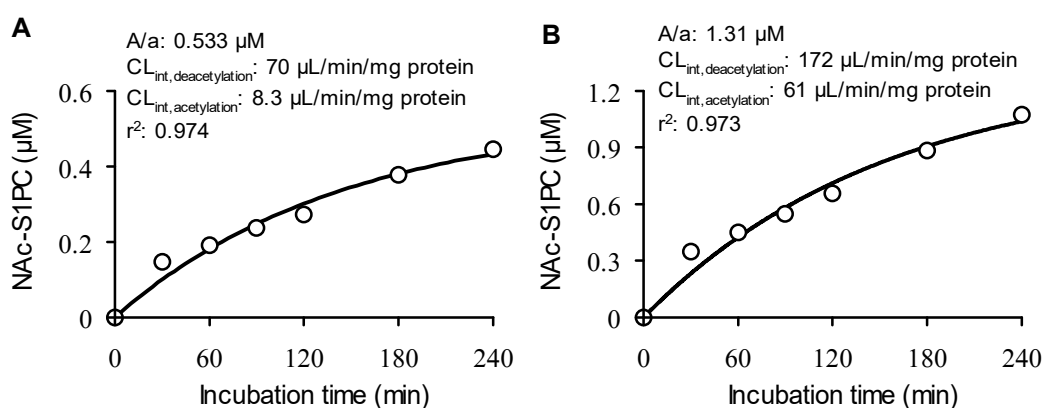


Fig. 32 Concentration of NAc-S1PC formed-time plots in the incubation mixtures for S1PC N-acetylation by human liver S9 fraction (A) and kidney S9 fraction (B).

Table 20 には、ラット、イヌ、およびヒトの肝臓と腎臓の S9 画分による S1PC の N-アセチル化反応と NAc-S1PC の脱アセチル化反応の CL_{int} を示した。尚、 CL_{int} は S9 蛋白量当たりの値に加えて、体重 kg 当たりの値も併せて算出した。SAC の場合と同様に、S1PC の N-アセチル化と NAc-S1PC の脱アセチル化の優位性には種差があることが示された。ラットの肝臓と腎臓の S1PC の N-アセチル化活性は NAc-S1PC の脱アセチル化活性よりも 5~6 倍高く、S1PC から NAc-S1PC の生成は肝臓と腎臓の両臓器

で起こることが示された。一方、イヌの肝臓における SIPC の N-アセチル化活性と NAc-SIPC の脱アセチル化活性は同程度であるのに対し、イヌ腎臓の NAc-SIPC の脱アセチル化活性は SIPC の N-アセチル化活性よりも約 380 倍高いことが示された。このことから、SIPC から NAc-SIPC の生成は肝臓で起こり、腎臓では逆に NAc-SIPC が SIPC へ代謝されることが示唆された。また、ヒトの肝臓と腎臓の NAc-SIPC の脱アセチル化活性は SIPC の N-アセチル化活性よりも 3~9 倍高いことが示され、ヒトでは SIPC から NAc-SIPC の生成が起こり難いことが示唆された。以上の結果から、肝臓と腎臓の SIPC の N-アセチル化と NAc-SIPC の脱アセチル化の優位性は SAC の N-アセチル化と NAc-SAC の脱アセチル化の場合と同様であることが示された。

Table 20 CL_{int} values for N-acetylation of SIPC and for deacetylation of NAc-SIPC in liver and kidney S9 fractions of rat, dog, and human.

Species	S9	N-acetylation	Deacetylation
$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein			
Rat	Liver	82	15
	Kidney	422	74
Dog	Liver	1.3	1.3
	Kidney	3.6	1336
Human	Liver	8.3	70
	Kidney	61	172
$\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$ body weight			
Rat ^{a)}	Liver ^{d)}	398	72
	Kidney ^{e)}	315	55
Dog ^{b)}	Liver ^{d)}	5.0	5.2
	Kidney ^{e)}	1.7	625
Human ^{c)}	Liver ^{d)}	26	216
	Kidney ^{e)}	25	71

^{a)}40 g liver/kg body weight, 8.0 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{b)}32 g liver/kg body weight, 5.0 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{c)}26 g liver/kg body weight, 4.4 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{d)}121 mg S9 protein/g liver²⁷⁾. ^{e)}93.5 mg S9 protein/g kidney²⁷⁾.

2-d 考察

SIPC はその構造が SAC の構造と類似し、AGE 中の含量も SAC の含量と同程度であることから、AGE の薬効成分の一つとして期待されている。しかし、その体内動態は全く研究されてこなかった。

本節では SAC の研究で得られた知見にもとづき、SIPC の体内動態とその N-アセチル化代謝を明らかにすることを目的として、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。SIPC の投与量は、SAC の場合と同様に、ラットでは 5 mg/kg、イヌでは 2 mg/kg に設定した。

まず、SAC や SMC と同様に、SIPC は経口吸収性に優れ、ラットとイヌでの bioavailability はそれぞ

れ、88.0%と100%であった。

ラットにおいて、SIPCはN-アセチル化やS-酸化を受けてNAc-SIPCやNAc-SIPCSへと代謝され、SIPCと代謝物の血漿中濃度はSIPC>NAc-SIPC>>NAc-SIPCSの順で推移した(Fig. 26AとFig. 26B)。しかし、SIPCの静脈内投与後、SIPCは未変化体としてはほとんど排泄されず、尿中に排泄されたNAc-SIPCとNAc-SIPCSの合計はSIPC投与量の86%であることが示され、SACの場合と同様に、SIPCは主にN-アセチル化代謝物として尿中へ排泄されることが明らかとなった(Table 16)。これらの結果は、SACの場合と同様に、未変化体(SIPC)とN-アセチル化代謝物(NAc-SIPCとNAc-SIPCS)の腎排泄様式の違いによって説明可能と思われた。即ち、SIPCのCL_r(0.030 L/h/kg)は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス(0.23 L/h/kg)に比べて著しく小さい値であることが示され、SIPCは腎尿細管から再吸収されることが示唆された(Table 17)。SIPCも、SACやSMCと同様に、腎尿細管に局在するアミノ酸やcysteine-S-conjugateの再吸収に関与する各種トランスポーターを介して再吸収されると考えられる³¹⁻³³)。一方、NAc-SIPCとNAc-SIPCSのCL_r(0.96 L/h/kgと1.0 L/h/kg)は糸球体ろ過に依存した腎クリアランス(0.22 L/h/kgと0.17 L/h/kg)を大きく上回ることが示され(Table 17)、SIPCのN-アセチル化代謝物は尿中へ能動的に分泌されることが示唆された。SACの場合に考察されたように、mercapturic acidが腎近位尿細管に存在するRenal Organic Anion Transporter 1を介して能動的に尿中排泄されることが示唆されており³⁴⁻³⁶)、mercapturic acidの一つであるNAc-SIPC、およびそのS酸化体であるNAc-SIPCSも本輸送系を介して尿中へ分泌されていることが推測された。さらに、SIPC投与後に得られたNAc-SIPCのCL_r(4.0 L/h/kg)は、NAc-SIPC投与後に得られたCL_r(0.96 L/h/kg)より大きな値となることが示され(Table 17)、腎臓に到達したSIPCの一部はN-アセチル化を受けた後、そのままNAc-SIPCとして尿中へ排泄されている可能性が示された。このことは、ラットの肝臓と腎臓のS9画分を用いた*in vitro*代謝実験において、SIPCのN-アセチル化活性はNAc-SIPCの脱アセチル化活性よりも5~6倍高いことから支持された(Table 20)。このことから、SIPC投与後に得られたNAc-SIPCのCL_rには、腎臓でSIPCから生成し、そのまま尿中へ排泄されたNAc-SIPCが加味されていると考えられ、SIPC投与後に得られたNAc-SIPCのCL_rが過大評価されていると考えられた。さらに、NAc-SIPCSのCL_rについても、NAc-SIPC投与後とNAc-SIPCS投与後に得られた値(7.4 L/h/kgと1.0 L/h/kg)を比較すると、NAc-SIPC投与後の方が7.4倍も大きな値を与えることが分かった(Table 17)。このことから、NAc-SIPCのS-酸化も腎臓内で起こり、生成したNAc-SIPCSがそのまま尿中に排泄されており、NAc-SIPC投与後に得られたNAc-SIPCSのCL_rが過大評価されていると考えられた。

以上の腎クリアランスの解析結果と*in vitro*代謝実験の結果から、SACの場合に考察されたように、SIPCは腎臓での再吸収を介して全身を再循環し、最終的には肝臓や腎臓でNAc-SIPCやNAc-SIPCSへと代謝された後、尿中に能動的に分泌されていると考えられた。

イヌにおいても NAc-SIPC が SIPC の主要代謝物であり、SIPC の経口、および静脈内投与後、SIPC とその N-アセチル化代謝物の血漿中濃度は SIPC>NAc-SIPC>>NAc-SIPCS の順で推移した (Fig. 27A と Fig. 27B)。ラットの場合と同様に、SIPC の投与後、SIPC はほとんど尿中に排泄されず (Table 18)、その CL_r は糸球体ろ過に依存した腎クリアランスの約 0.08% となることが示され (Table 19)、腎尿細管から再吸収されることが示唆された。一方、NAc-SIPC もほとんど尿中に排泄されなかったが、*in vitro* 代謝試験において、イヌ腎臓の NAc-SIPC の脱アセチル化活性は SIPC の N-アセチル化活性よりも約 380 倍高いことが示され (Table 20)、NAc-SIPC は腎排泄過程でそのほとんどが SIPC へ代謝されている可能性が示された。以上のことから、SAC の場合に考察されたように、主要代謝物である NAc-SIPC が腎排泄過程で SIPC へ代謝される結果として、投与された SIPC 量の大部分が再吸収を介して全身を再循環することになり、その血漿中濃度は持続 ($t_{1/2}$, 5.3~5.6 h) するものと考えられた。

本節において、SIPC のラットとイヌにおける N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態は SAC のそれと極めて類似していることが明らかとなった。SIPC は経口吸収性に優れ、N-アセチル化代謝が主要な消失経路であること、加えて、腎尿細管で再吸収を受けるため、特にイヌにおいて血中濃度が持続することが示された。さらに、SAC の場合と同様に、排泄臓器である腎臓が、その代謝 (N-アセチル化と脱アセチル化の優位性) と排泄 (再吸収と分泌の寄与) を介して、N-アセチル化代謝物の尿中排泄、ひいては SIPC の血中濃度の持続に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。

第3節 SAC、SMC、S1PC のラットとイヌにおける体内動態のまとめ

第I~III章ではAGE中の代表的な水溶性化合物であるSAC、SMC、S1PCの体内動態とそのN-アセチル化代謝を明らかにすることを目的として、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて、種々、検討を行った。

まず、SAC、SMC、およびS1PCのラットとイヌでの *bioavailability* は88.0~100%であり、ともに経口吸収性に優れることが示された。哺乳類におけるアミノ酸の吸収は消化管上皮の刷子縁膜に存在する酸性、中性、および塩基性アミノ酸に選択的な各種トランスポーターを介して行われる。SAC、SMC、S1PCの吸収機構に関する研究報告はないが、これらの化合物は *cysteine-S-conjugate* であることから、*cysteine* の吸収に関与するアミノ酸トランスポーターを介して吸収されることが推測される³¹⁾。

ラットにおいて、SAC、SMC、およびS1PCはその未変化体が尿・胆汁中にほとんど排泄されず、3化合物の血中からの消失は主に代謝に依存していることが示された (Table 21)。さらに、SAC、SMC、S1PCはいずれもN-アセチル化代謝を受けるものの、その程度はSAC、S1PCとSMCの間で大きく異なることも明らかとなった。即ち、SACとS1PCの主要な血中代謝物はそれぞれ、NAc-SACとNAc-S1PCであり、SACとS1PCは主にN-アセチル化代謝物として尿中へ排泄される (Table 21)。一方、SMC投与後の血漿中に出現するNAc-SMCの濃度はSMCの濃度に比べて極めて低く、SACやS1PCとは異なり、SMCはN-アセチル化代謝を受け難いことが示された (Fig. 21AとFig. 21B)。

Table 21. Urinary and biliary excretion of SAC, SMC, S1PC, and their *N*-acetylated and *N*-acetylated/*S*-oxidized metabolites in rats after i.v. administration.

Compound ^a	Excreta	Excretion (% of Dose) ^b			
		Unchanged ^c	<i>N</i> -acetylated ^d	<i>N</i> -acetylated/ <i>S</i> -oxidized ^e	Total
SAC	urine	0.95 ± 0.14	84 ± 3.9	11 ± 0.09	96 ± 3.8
	bile	0.51 ± 0.09	0.92 ± 0.47	0.06 ± 0.04	1.5 ± 0.59
SMC	urine	1.8 ± 0.58	13 ± 3.6	10 ± 2.4	25 ± 5.7
	bile	4.9 ± 1.6	n.d.	n.d.	4.9 ± 1.6
S1PC	urine	2.2 ± 0.42	73 ± 2.8	13 ± 1.1	88 ± 2.2
	bile	0.35 ± 0.15	0.26 ± 0.18	0.01 ± 0.01	0.62 ± 0.34

Data represent mean ± S.D. of three rats. n.d., not detected.

^aA single i.v. dose of SAC (5mg/kg), SMC (2 mg/kg), and S1PC (5 mg/kg) was administered to rats.

^bExcreted amount (% of dose, on a molar basis) in urine and bile for 24 h postdose.

^cSAC, SMC, and S1PC. ^dNAc-SAC, NAc-SMC, and NAc-S1PC. ^eNAc-SACS, NAc-SMCS, and NAc-S1PCS.

このような、*in vivo* におけるN-アセチル化代謝の受け易さの違いは、*in vitro* 代謝試験での結果によって裏付けられた (Table 22)。ラットの肝臓と腎臓のSACとS1PCのN-アセチル化活性はそれぞれ、NAc-SACとNAc-S1PCの脱アセチル化活性よりも5~7倍高いことが示され (Table 22)、このことから、

SACとSIPCのN-アセチル化代謝物(NAc-SACとNAc-SIPC)は肝臓と腎臓で生成し、特に腎臓で生成したN-アセチル化代謝物の一部は、そのまま尿中へ排泄されていることが示唆された。一方、肝臓にはSMCのN-アセチル化活性が検出されず、腎臓のNAc-SMCの脱アセチル化活性はSMCのN-アセチル化活性よりも約9倍高いことが明らかになり、SMCからNAc-SMCの生成は起こり難く、血中を循環するNAc-SMCは主に腎臓で生成していることが示された。

Table 22 CL_{int} values for *N*-acetylation of SAC, SMC, and SIPC and for deacetylation of NAc-SAC, NAc-SMC, and NAc-SIPC in liver and kidney S9 fractions of rat, dog, and human.

NAc-SMC, and NAc-SIPC in liver and kidney S9 fractions of rat, dog, and human.							
Species	S9	N-acetylation			Deacetylation		
		SAC	SMC	SIPC	NAc-SAC	NAc-SMC	NAc-SIPC
μL/min/mg S9 protein							
Rat	Liver	30	n.d.	82	5.9	68	15
	Kidney	190	36	422	27	314	74
Dog	Liver	0.56	n.d.	1.3	0.45	34	1.3
	Kidney	5.9	5.6	3.6	458	917	1336
Human	Liver	1.0	0.74	8.3	14	77	70
	Kidney	4.9	1.1	61	34	104	172
mL/min/kg body weight							
Rat ^{a)}	Liver ^{d)}	148	n.d.	398	28	327	72
	Kidney ^{e)}	142	27	315	20	235	55
Dog ^{b)}	Liver ^{d)}	2.2	n.d.	5.0	1.7	131	5.2
	Kidney ^{e)}	2.7	2.6	1.7	214	429	625
Human ^{c)}	Liver ^{d)}	3.3	2.3	26	43	241	216
	Kidney ^{e)}	2.0	0.44	25	14	43	71

^{a)}40 g liver/kg body weight, 8.0 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{b)}32 g liver/kg body weight, 5.0 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{c)}26 g liver/kg body weight, 4.4 g kidney/kg body weight²⁶⁾. ^{d)}121 mg S9 protein/g liver²⁷⁾. ^{e)}93.5 mg S9 protein/g kidney²⁷⁾. n.d., not detected.

さらに、SAC、SMC、SIPCとそのN-アセチル化代謝物の CL_r を、それぞれの糸球体ろ過に依存した腎クリアランスの見積もり値と比較した結果(Table 23)、未変化体(SAC、SMC、SIPC)とN-アセチル化代謝物(NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC)の腎排泄様式は異なることが示唆された。即ち、未変化体は腎尿細管から再吸収されるのに対し、そのN-アセチル化代謝物は尿中へ能動的に分泌されることが示唆された。

以上のラットでの研究結果から、SACとSIPCの血中からの消失は主にN-アセチル化代謝に依存することが示され、SACとSIPCは腎尿細管での再吸収を介して全身を再循環し、最終的にはN-アセチル化代謝物に代謝された後、尿中に能動的に分泌されと考えられた。一方、SACやSIPCと同様に、SMCも腎尿細管から再吸収されて全身を再循環するが、N-アセチル化代謝を受け難く、報告されているように²³⁻²⁵⁾、主に無機イオウ化合物として、尿中へ排泄されているものと推測された。

Table 23 Pharmacokinetic parameters of SAC, SMC, and S1PC in rats after i.v. administration.

Parameters	Dosed compounds		
	SAC ^a	SMC ^a	S1PC ^a
CL _{tot} (L/h/kg)	0.91 ± 0.035	0.32 ± 0.033	1.4 ± 0.078
t _{1/2} (h) at terminal	1.1 ± 0.27	2.6 ± 0.22	0.52 ± 0.10
CL _r (L/h/kg)	0.0086	0.0059	0.030
GFR ^b × f _{up} ((L/h/kg)	0.24	0.29	0.23
MRT (h)	1.1 ± 0.081	3.8 ± 0.27	0.56 ± 0.069
Vd _{ss} (L/kg)	1.0 ± 0.072	1.2 ± 0.045	0.77 ± 0.051
AUC (mg/h/L)	5.50 ± 0.21	6.24 ± 0.61	3.66 ± 0.21
AUC (mg/h/L) of metabolites			
N-acetylated ^c	1.80 ± 0.19	0.097 ± 0.012	1.14 ± 0.15
N-acetylated/S-oxidized ^d	0.13 ± 0.028	n.d.	0.10 ± 0.016
CL _r (L/h/kg) of metabolites			
N-acetylated ^c	2.9 (1.5) ^e	3.4 (0.14) ^e	4.0 (0.96) ^e
N-acetylated/S-oxidized ^d	5.7 (1.2) ^f	n.c. (0.45) ^f	9.1 (1.0) ^f
GFR ^b × f _{up} (L/h/kg) of metabolites			
N-acetylated ^c	0.14	0.22	0.22
N-acetylated/S-oxidized ^d	0.21	0.22	0.17

Data represent mean ± S.D. of three to four rats. n.d., not detected. n.c., not calculated.

^aA single i.v. dose of SAC (5 mg/kg), SMC (2 mg/kg), and S1PC (5 mg/kg) was administered to rats.

^bGFR, 0.3 L/h/kg²⁶. ^cNAc-SAC, NAc-SMC, and NAc-S1PC. ^dNAc-SACS, NAc-SMCS, and NAc-S1PCS.

^eCL_r calculated using the data obtained after administration of NAc-SAC, NAc-SMC, and NAc-S1PC.

^fCL_r calculated using the data obtained after administration of NAc-SACS, NAc-SMCS, and NAc-S1PCS.

イヌにおいては、SAC、SMC、S1PC の t_{1/2} は大きい値 (5.3~12 h) であることが示され、いずれの化合物もその血中濃度が持続することが明らかとなった。ラットの場合と同様に、イヌにおいても SAC と S1PC の主要な血中代謝物は N-アセチル化代謝物 (NAc-SAC と NAc-S1PC) であるのに対し、SMC から NAc-SMC の生成は起こり難いことが明らかとなった。さらに、SAC、SMC、S1PC はイヌの尿中にほとんど排泄されないことが示され (Table 24)、その CL_r を糸球体ろ過に依存した腎クリアランスと比較した結果から、ラットの場合と同様に、3 化合物はいずれも腎尿細管から再吸収されることが示唆された (Table 25)。その一方で、ラットの場合とは異なり、SAC、SMC、S1PC の N-アセチル化代謝物 (NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-S1PC) はイヌの尿中にほとんど排泄されないことも明らかとなった (Table 24)。この理由は *in vitro* 代謝試験における肝臓と腎臓の N-アセチル化活性と脱アセチル化活性の比較から、明らかになった。即ち、イヌの腎臓は強力な NAc-SAC と NAc-S1PC の脱アセチル化活性を有することが明らかになり (Table 22)、血中を循環する NAc-SAC と NAc-S1PC は尿中へ排泄される過程でそのほとんどが脱アセチル化されている可能性が強く示された。一方、イヌの肝臓には SMC の N-アセチル化活性が検出されず、加えて、腎臓は強力な NAc-SMC の脱アセチル化活性を有することが

明らかになり、NAc-SMC も尿中へ排泄される過程でそのほとんどが脱アセチル化されていることが示唆された。

Table 24. Urinary excretion of SAC, SMC, S1PC, and their *N*-acetylated and *N*-acetylated/*S*-oxidized metabolites in dogs after i.v. administration.

Compound ^a	Excretion (% of Dose) ^b			
	Unchanged ^c	<i>N</i> -acetylated ^d	<i>N</i> -acetylated/ <i>S</i> -oxidized ^e	Total
SAC	0.32 ± 0.07	0.89 ± 0.18	12 ± 1.7	13 ± 1.5
SMC	0.20 ± 0.16	n.d.	0.52 ± 0.31	0.72 ± 0.42
S1PC	0.21 ± 0.06	0.86 ± 0.44	2.3 ± 1.2	3.4 ± 1.7

Data represent mean ± S.D. of three dogs. n.d., not detected.

^a A single i.v. dose (2mg/kg) of SAC, SMC, and S1PC was administered to dogs.

^b Excreted amount (% of dose, on a molar basis) in urine for 48 h postdose.

^c SAC, SMC, and S1PC. ^d NAc-SAC, NAc-SMC, and NAc-S1PC. ^e NAc-SACS, NAc-SMCS, and NAc-S1PCS.

Table 25 Pharmacokinetic parameters of SAC, SMC, and S1PC in dogs after i.v. administration.

Parameters	Dosed compounds		
	SAC ^a	SMC ^a	S1PC ^a
CL _{tot} (mL/h/kg)	48 ± 5.7	48 ± 7.9	110 ± 4.6
t _{1/2} (h) at terminal	12 ± 0.39	8.9 ± 1.3	5.3 ± 0.38
CL _r (mL/h/kg)	0.15 ± 0.017	0.086 ± 0.064	0.23 ± 0.070
GFR ^b × f _{u,p} (mL/h/kg)	290	330	270
MRT (h)	17 ± 0.48	11 ± 1.6	7.3 ± 0.57
Vd _{ss} (L/kg)	0.83 ± 0.10	0.54 ± 0.099	0.78 ± 0.027
AUC (mg·h/L)	42.1 ± 4.96	42.8 ± 6.53	18.7 ± 0.83
AUC (mg·h/L) of metabolites			
<i>N</i> -acetylated ^c	24.4 ± 6.09	0.57 ± 0.21	9.29 ± 1.91
<i>N</i> -acetylated/ <i>S</i> -oxidized ^d	2.85 ± 0.56	n.d.	0.54 ± 0.11
CL _r (mL/h/kg) of metabolites			
<i>N</i> -acetylated ^c	0.93 ± 0.047	n.c.	2.4 ± 1.2
<i>N</i> -acetylated/ <i>S</i> -oxidized ^d	120 ± 37	-	120 ± 56
GFR ^b × f _{u,p} (mL/h/kg) of metabolites			
<i>N</i> -acetylated ^c	240	n.e.	250
<i>N</i> -acetylated/ <i>S</i> -oxidized ^d	260	n.e.	190

Data represent mean ± S.D. of three to four rats. n.d., not detected. n.e., not examined. n.c., not calculated.

^a A single i.v. dose (2 mg/kg) of SAC, SMC, and S1PC was administered to dogs. ^b GFR, 0.36 L/h/kg²⁶⁾.

^c NAc-SAC, NAc-SMC, and NAc-S1PC. ^d NAc-SACS, NAc-SMCS, and NAc-S1PCS.

以上のイヌでの研究結果から、ラットの場合と同様に、SAC と S1PC の主要な血中代謝物は *N*-アセチル化代謝物 (NAc-SAC と NAc-S1PC) であることが示されたが、腎臓に到達した *N*-アセチル化代謝物はそのままの形で尿中へ排泄されておらず、それぞれ SAC と S1PC へ代謝されていると考えられ

た。従って、投与された SAC と SIPC の大部分は腎尿細管からの再吸収を介して全身を再循環することになり、その結果として、SAC と SIPC の血中濃度は長時間、持続するものと推測された。一方、ラットの場合と同様に、イヌにおいても SMC は N-アセチル化代謝をほとんど受けず、SAC と SIPC と同様に腎臓で再吸収されることが示唆され、その結果として、SMC の血中濃度もやはり持続するものと推測された。

さらに、*in vitro* 代謝試験の結果から、ヒトの肝臓と腎臓はともに、SAC、SMC、および SIPC の N-アセチル化に対して、NAc-SAC、NAc-SMC、および NAc-SIPCS の脱アセチル化が優位であり、ヒトにおいては、3 化合物はいずれも N-アセチル化代謝を受け難いことが推測された (Table22)。

本研究において、SAC、SMC、および SIPC のラットとイヌにおける体内動態は優れた経口吸収性と腎臓での再吸によって特徴付けられることが示された。ヒトにおいても 3 化合物が腎尿細管のトランスポーターを介して再吸収されると仮定した場合、ヒトへ投与された SAC、SMC、SIPC は N-アセチル化代謝を受け難いと推測されるため、血中には主に未変化体として存在し、その血中濃度は腎臓での再吸収を介して持続することが推察される。

第 IV 章 SAC、SMC、SIPC のヒト CYP 酵素活性に及ぼす影響

第 I 章~第 III 章において、AGE の主要な水溶性イオウ化合物である SAC、SMC、SIPC のラットとイヌにおける代謝、排泄、および血中動態に関する研究を行い、3 化合物の経口吸収性は優れていることが示された。また、SAC、SMC、SIPC はいずれも腎臓で再吸収を受けると考えられることから、その血中濃度が持続し、特にイヌにおいては長い $t_{1/2}$ を持つことが明らかとなった。一方、その代謝には大きな違いが認められ、SAC と SIPC は主に N-アセチル化代謝によって消失するのに対し、SMC は N-アセチル化をほとんど受けないことも明らかとなった。

ニンニクは古来より世界中で消費され、健康促進や疾病予防のための民間薬として、その有用性が幅広く認識されている¹⁴⁾。その一方で、近年のハーブに代表される植物療法薬の使用増加に伴い、植物療法薬と医療用医薬品との併用時に生じる薬物相互作用が懸念され、実際に多くの事例が報告されている。代表的な例として St. John's wort (セイヨウオトギリソウ) が挙げられる。St. John's wort は CYP3A4 や CYP1A2 を誘導することによって、CYP で代謝される多くの医薬品の血中濃度を減少させる⁵⁶⁾。また、Ginkgo biloba extract (イチョウ葉エキス) は CYP2C9 を誘導、あるいは CYP3A4 を阻害することによって、それぞれ抗糖尿病薬 tolbutamide の血中濃度を低下させ、あるいは鎮静薬 midazolam の血中濃度を上昇させることが報告されている⁵⁷⁾。このように、薬物相互作用の多くは CYP の阻害や誘導によって引き起こされることから、植物療法薬やその成分の CYP 酵素活性に及ぼす影響が実験室レベル、あるいは臨床試験で調べられている⁵⁸⁻⁶⁰⁾。

臨床的に最も重要な薬物代謝酵素の一つである CYP は、その基質特異性が低いことから、医薬品の 70% 以上の代謝に関与していることが報告されている^{61,62)}。また、CYP には数多くのアイソフォームが存在するが⁶³⁻⁶⁵⁾、その中で主に 5 つのアイソフォーム (CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4/5) が医薬品の代謝に関わっている^{66,67)}。従って、CYP の阻害や誘導に基づく薬物相互作用の評価においては、これら 5 つのアイソフォームの酵素活性に対する影響が *in vitro* や *in vivo* で調べられる。

これまでに、ニンニク製剤の CYP 酵素活性に及ぼす影響が幾つかの臨床試験において調べられている。Markowitz ら⁶⁸⁾ は健常者にニンニク抽出物を 14 日間、経口摂取させても、CYP2D6 と CYP3A4 の酵素活性に影響がないことを報告している。また、ニンニク抽出物の 4 日間の経口摂取は CYP3A4/5 の基質である ritonavir の薬物動態に影響しないことも報告されている⁶⁹⁾。一方、ニンニク粉末の 21 日間の経口摂取によって CYP3A4 の基質である saquinavir の bioavailability が低下し、これは小腸の CYP3A4 が誘導された結果と解釈されている⁷⁰⁾。このように、ニンニク製剤の CYP に対する影響は、製剤化の方法や含有成分の違いに依存して異なると考えられ、一定の見解を得るに至っていない。

AGE は長期間の熟成・抽出期間を経て調製されるユニークなニンニク製剤であり、その熟成過程に

において生ニンニク中に存在する臭気性や刺激性のある成分は減少し、SAC に代表されるような水溶性イオウ化合物が増加する。これまでに、AGE について多くの臨床試験が実施され⁸⁻¹¹⁾、その有用性が検証されてきた。近年、降圧剤が無効の患者において AGE の併用が有意に血圧を低下させること⁹⁾、あるいは高脂血症薬を服用中の心臓病発症のリスクが高い患者において、AGE の併用が冠動脈石灰化の進行を抑制すること¹⁰⁾が報告され、AGE は医薬品の補完薬として、安全かつ有効的に併用され得ることが示された。しかし、一方で、これまでに、AGE の CYP 酵素活性に及ぼす影響を調べる目的で実施された臨床試験はない。降圧剤や高脂血症薬の多くが CYP によって代謝・消失される^{71,72)}ことを考えると、AGE やその成分の CYP 酵素活性に及ぼす影響を明らかにすることは極めて重要と考えられる。そこで、本章では、AGE 中の代表的な水溶性イオウ化合物である SAC、SMC、SIPC と、その主要な代謝物である N-アセチル化代謝物の CYP の酵素活性に及ぼす影響を *in vitro* 評価系を用いて検討した。

第1節 実験条件の確立

前述したように、CYP には複数のアイソフォームが存在し⁶³⁻⁶⁵⁾、その中で医薬品の代謝に関与するのは主に CYP1A2、2C9、2C19、2D6、および 3A4 の 5 つのアイソフォームである^{66,67)}。CYP の各アイソフォームの酵素活性に及ぼす影響を *in vitro* で評価する系には 2 種類あり、一つは各アイソフォームのリコンビナント発現系と人工蛍光基質を用いる方法⁷³⁻⁷⁵⁾、もう一つはヒト肝ミクロソームとプローブ基質を用いる方法である⁷⁶⁻⁷⁹⁾。前者は各アイソフォームの酵素活性を、生成した代謝物に由来する蛍光強度で検出できるように簡便な評価系として汎用されているものの、医薬品を基質に用いた場合と結果が一致しないケースが数多く報告されており⁸⁰⁻⁸³⁾、信頼性に問題があると考えられる。一方、後者は肝ミクロソーム中に含まれる各アイソフォームの酵素活性を、アイソフォーム特異的な代謝反応によって生成する代謝物量で評価する系であり、実際の医薬品をプローブ基質として用いることもあり、臨床試験の結果とも良く相関することが報告されている^{29,84-86)}。実際に、肝ミクロソームを用いる評価系は、本邦のガイドライン(医薬品開発の適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン)において薬物相互作用の評価系として記載されており、各アイソフォームのプローブ基質と測定すべき代謝物が指定されている。

そこで本節では、水溶性イオウ化合物の CYP 酵素活性に及ぼす影響を調べるにあたり、ヒト肝ミクロソームと各アイソフォームのプローブ基質を用いた評価系を用いることとし、その実験条件を決定した。また、既知阻害剤の各アイソフォームの酵素活性に対する阻害活性を測定し、これまでの報告値と比較することで評価系の妥当性を検証した。

1-a プローブ基質の濃度、ヒト肝ミクロソームの蛋白濃度、反応時間の決定

一般に、酵素阻害剤の阻害活性は、阻害定数である K_i 値や酵素反応速度を 50%低下させる濃度 (IC_{50} 値) で評価される。 K_i 値は阻害剤の酵素に対する親和性を表す解離定数であり、その値は測定条件に依存せず、阻害剤に固有の値として算出される。一方、 IC_{50} 値は、阻害剤が基質の代謝反応を 50%阻害するのに必要な濃度であり、 K_i 値に比べて容易に測定できることから阻害活性の指標として汎用される。しかし、用いる基質濃度の大小によって IC_{50} 値の大きさが変動することから、 K_i 値との間に乖離が生じることがある。そこで、この K_i 値と IC_{50} 値の差を最小限に留め、かつ両値の関係を単純化するためには、基質の濃度を K_m 値付近とすることが望ましい。その場合、阻害が競合的阻害、および非競合的阻害である場合、 $K_i = IC_{50}/2$ 、非競合的阻害である場合には $K_i \approx IC_{50}$ の関係式が理論的に成立する⁸⁷⁾。また、反応液中の肝ミクロソーム蛋白の濃度は評価化合物の酵素蛋白以外への結合を抑えるためになるべく低く設定し、実験操作による誤差を最小限に抑えるために適度な長さの反応時間を設定する必要がある。

そこで、本節ではヒト肝ミクロソーム中の CYP1A2、2C9、2C19、2D6、および 3A4 による特異的な代謝反応(プローブ基質の代謝反応)について、これまでの研究報告^{77,84,88-91)}をもとに検討を行い、反応条件(基質濃度、ヒト肝ミクロソームの蛋白濃度、反応時間)を決定した。本邦のガイドライン(医薬品開発の適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン)に従い、CYP1A2 による反応では phenacetin の O-脱エチル化により生成する acetaminophen を、CYP2C9 による反応では diclofenac の水酸化により生成する 4'-hydroxydiclofenac を、CYP2C19 による反応では S-mephenytoin の水酸化により生成する 4'-hydroxymephenytoin を、CYP2D6 による反応では dextromethorphan の脱メチル化により生成する dextrorphan を、および CYP3A による反応では midazolam、testosterone の水酸化により生成する 1'-hydroxymidazolam、6 β -hydroxytestosterone を、それぞれ測定することとした。まず、各 CYP アイソフォームのプローブ基質の濃度を、これまでの研究^{77,84,88-91)}で報告されている K_m 値付近に固定し、各プローブ基質の代謝物の生成速度がヒト肝ミクロソームの蛋白濃度(3 濃度、0.02~0.4 mg/mL)と反応時間(4~5 ポイント、2~90 min)に依存して直線的に進行することを確認した。その上で、代謝物の分析精度を考慮し、各 CYP アイソフォームによる代謝反応のそれぞれについて、ヒト肝ミクロソームの蛋白濃度と反応時間を決定した(Table 26)。さらに、その反応条件下で各プローブ基質の種々の濃度における代謝物の生成速度を測定し、各基質濃度における代謝物の生成速度をプロットした。非線形最小二乗法により得られた当てはめ曲線をもとに K_m 値を算出し、その値をもとに基質濃度を決定した(Table 26)。

Table 26 Human CYP isoforms, probe substrates with their K_m values and test concentrations, metabolites analyzed, incubation time, and protein concentration of HLM.

CYP Isoform	Substrate	K_m μM	Conc. μM	Detected Metabolite	Incubation min	HLM mg/mL
1A2	Phenacetin	40	40	Acetaminophen	40	0.2
2C9	Diclofenac	16	10	4'-Hydroxydiclofenac	15	0.2
2C19	S-Mephenytoin	50	50	4'-Hydroxymephenytoin	90	0.4
2D6	Dextromethorphan	3.1	2	Dextrophan	15	0.2
3A4	Midazolam	1.2	1	1'-Hydroxymidazolam	15	0.05
	Testosterone	47	40	6 β -Hydroxytestosterone	15	0.05

HLM, human liver microsomes.

1-b 既知阻害剤の IC_{50} 値

上記 1-a で設定した反応条件下で、各 CYP アイソフォームの既知阻害剤の IC_{50} 値を測定・算出し、これまでに報告されている値と比較することで、実験条件の妥当性を評価した。

Fig. 33 には CYP2C19 の阻害剤である ticlopidine の濃度-阻害曲線を示した。非線形最小二乗法により得られた当てはめ曲線をもとに IC_{50} 値を算出すると、 $0.70 \mu\text{M}$ という値が得られた。他のアイソフォームの阻害剤についても同様の解析を行い、それぞれの IC_{50} 値を算出した。Table 27 に、各 CYP アイソフォームの阻害剤とその試験濃度範囲、本検討で得られた IC_{50} 値、および IC_{50} 値の報告値をまとめた。本検討で得られた furafyllin (CYP1A2 阻害剤)、sulfaphenazole (CYP2C9 阻害剤)、ticlopidine (CYP2C19 阻害剤)、quinidine (CYP2D6 阻害剤)、および ketoconazole (CYP3A4 阻害剤) の IC_{50} 値はそれぞれ、2.0、0.26、0.70、0.021、および $0.012\sim0.013 \mu\text{M}$ であり、これまでに報告された値と同程度の IC_{50} 値であることが確認された。これらの結果は本節で決定した反応条件の妥当性を示すものであり、次節において、本反応条件を用いて SAC、SMC、SIPC とその N-アセチル化代謝物の各 CYP アイソフォームの酵素活性に及ぼす影響を検討することとした。

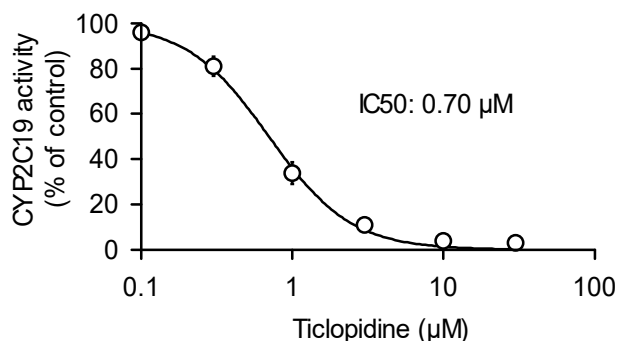


Fig. 33 A representative concentration-inhibition curve (CYP2C19, ticlopidine) in the CYP inhibition studies of known chemical inhibitors using HLM.

Table 27 IC₅₀ values of known chemical inhibitors for five isoforms of human CYP.

CYP Isoform	Inhibitor	Test conc. Range μM	IC ₅₀ μM	IC ₅₀ ^a μM
1A2	Furafyllin	0.1–10	2.0	1.8, 5.6
2C9	Sulfaphenazole	0.03–10	0.26	0.25–0.52
2C19	Ticlopidine	0.1–30	0.70	0.78, 1.2
2D6	Quinidine	0.003–1	0.021	0.058–0.11
3A4 ^b	Ketoconazole	0.003–1	0.013	0.009–0.032
3A4 ^c	Ketoconazole	0.003–1	0.012	0.012–0.048

^aIC₅₀ values reported in references^{77,84,88–91}.^bMidazolam 1'-hydroxylation. ^cTestosterone 6β-hydroxylation.

第2節 SAC、SMC、S1PC のヒト CYP 酵素活性に及ぼす影響

第I章~第III章において、AGE 中に含まれる SAC、SMC、S1PC はラットとイヌにおいて経口吸収性に優れるが、未変化体としてはほとんど排泄されず、血中からの消失は主に代謝に依存することが示された。これまでに様々な植物療法薬の CYP 阻害作用が調べられているが^{92–95}、それらの植物薬に含まれる多様な成分の体内動態に関する情報は限られている。また、不安定な成分や経口吸収されない成分も多く含まれると予想され、それらの成分はたとえ *in vitro* で強力な CYP 阻害作用を示しても、*in vivo* では CYP の酵素活性にほとんど影響を与えないと考えられる。従って、植物療法薬の CYP 酵素活性に及ぼす影響を検討した *in vitro* 試験のデータは慎重に解釈されるべきであり、服用により実際に体内に吸収される成分を評価することが重要と思われる。また、体内で生成する代謝物が CYP 酵素活性に影響を及ぼす可能性も考慮して、主要な代謝物についても評価を行う必要がある。最終的には CYP を含めた全ての薬物代謝酵素に及ぼす影響を臨床試験で明らかにすることが望ましいが、実際に実施するのは非現実的かつ非効率的である。実際に臨床において検討する必要のある酵素については、*in vitro* 評価において絞り込むことが必要と思われる。植物療法薬は多様な成分の集合体であるが故に地道で多大な労力を要するが、それぞれの植物薬の主要な経口吸収成分を単離・同定し、薬物代謝酵素の活性に与える影響、あるいは酵素誘導に関するデータを蓄積し、共有することが重要と思われる。

本節では AGE 中の活性を示す経口吸収成分(経口活性成分)である SAC、SMC、S1PC とその代謝物(N-アセチル化代謝物と N-アセチル化/S-酸化代謝物)の CYP 酵素活性に及ぼす影響をヒト肝ミクロソームの *in vitro* 評価系を用いて明らかにした。

2-a ヒト肝ミクロソームに対する安定性

CYP の酵素活性に及ぼす影響を検討する前に、SAC、SMC、SIPC とその N-アセチル化代謝物、N-アセチル化/S-酸化代謝物がヒト肝ミクロソームとの反応において、代謝的に安定か否かについて検討した。ヒト肝ミクロソーム中には CYP も含めて様々な代謝酵素が存在することから、SAC、SMC、SIPC やその代謝物が肝ミクロソームとの反応中に代謝されることが懸念された。特に、SAC は *in vitro* 試験系において、flavin-containing monooxygenase によって S-酸化を受けることが報告されており²²⁾、注意が必要である。また、肝ミクロソームには carboxyesterase が含まれることから、N-アセチル化代謝物である NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC が脱アセチル化を受け、それぞれ SAC、SMC、SIPC へと代謝される可能性も懸念された。そこで、SAC、SMC、SIPC とその N-アセチル化代謝物、N-アセチル化/S-酸化代謝物のヒト肝ミクロソームに対する代謝安定性を確認することとした。

上記 1-a で決定した試験条件に即して、SAC、SMC、SIPC とその代謝物の濃度を 0.01 mM に、反応時間を 15~90 分間に、ヒト肝ミクロソーム蛋白濃度を 0.2 mg/mL に設定した。まず、SAC、SMC、および SIPC はヒト肝ミクロソームによる代謝を受けず、60 分間反応後の残存率は添加濃度に対して 99~105% であった。また、N-アセチル化/S-酸化代謝物である NAc-SACS、NAc-SMCS、および NAc-SIPCS も安定であり、60 分間反応後の残存率は添加濃度の 102~103% であった。一方、N-アセチル化代謝物である NAc-SAC、NAc-SMC、および NAc-SIPC はヒト肝ミクロソームによる脱アセチル化を受けた。90 分間反応後の NAc-SAC、NAc-SMC、および NAc-SIPC の残存率はそれぞれ、94%、85%、および 87% であることが示され、それに応じて脱アセチル化体である SAC、SMC、および SIPC が反応液中に検出された (Fig. 34)。また、15~90 分間反応後の NAc-SAC と SAC の合計、NAc-SMC と SMC の合計、および NAc-SIPC と SIPC の合計はそれぞれ、NAc-SAC 添加濃度の 98~102%、NAc-SMC 添加濃度の 98~100%、および NAc-SIPC 添加濃度の 91~100% (ともにモル濃度換算) であることが示され、脱アセチル化以外の代謝をほとんど受けないことも明らかとなった。NAc-SAC、NAc-SMC、および NAc-SIPC が脱アセチル化された割合は、15~90 分間反応後のほとんどの場合で 5% 以下であったが、40 分間反応後 (CYP1A2 試験系での反応時間) に NAc-SMC の 9.7% が SMC へと代謝され、90 分間反応後 (CYP2C19 試験系での反応時間) に NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC の 5.3%、17%、4.2% がそれぞれ、SAC、SMC、SIPC へと代謝された。実際の CYP2C19 酵素活性に及ぼす影響を調べる反応系においては、ヒト肝ミクロソーム蛋白濃度は本検討で用いた濃度よりも 2 倍高いことから、NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC が脱アセチル化される割合はそれぞれ 2 倍 (10.6%、34%、8.4%) になると予想された。

以上の結果から、SAC、SMC、SIPC とその N-アセチル化/S-酸化代謝物 (NAc-SACS、NAc-SMCS、

NAc-S1PCS)はヒト肝ミクロソームによる代謝を受けないのに対して、N-アセチル化代謝物(NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-S1PC)は脱アセチル化代謝を受けることが示され、NAc-SMCのCYP1A2酵素活性に及ぼす影響やNAc-SAC、NAc-SMC、NAc-S1PCのCYP2C19酵素活性に及ぼす影響を検討する場合には、試験中に生成する脱アセチル化体(SAC、SMC、S1PC)の作用を考慮する必要があると考えられた。

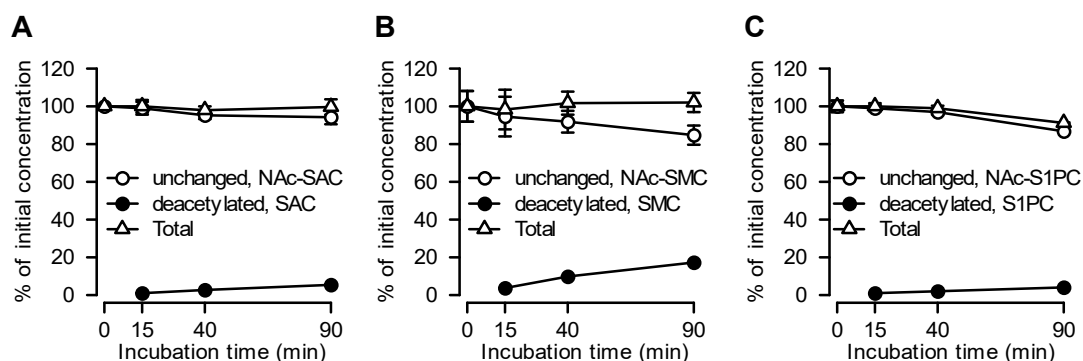


Fig. 34 Metabolic stability of NAc-SAC, NAc-SMC, and NAc-S1PC against HLM. After the incubation of HLM with NAc-SAC (A), NAc-SMC (B), and NAc-S1PC (C) at 10 μ M for 15–90 min, the amount of their unchanged and deacetylated forms was quantified with LC-MS/MS. Each point represents mean \pm S.D. (n=3).

2-b ヒト CYP 酵素反応に対する阻害活性

まず、ニンニク成分中の陽性対照化合物として allicin (diallyl thiosulfinate) を選択し、その CYP 酵素活性に及ぼす影響を、Table 26 に示した条件に従い検討した (Fig. 35)。Allicin は生ニンニク製剤の主要な成分であり、様々な CYP アイソフォームを阻害することが報告されている⁹⁶⁾。本検討においても、allicin は CYP1A2 と CYP3A4 による酵素反応に対して用量依存的な阻害作用を示し、その IC₅₀ 値はそれぞれ、67 μ M と 50–165 μ M (midazolam の 1'位水酸化反応に対して 50 μ M、testosterone の 6 位水酸化に対して 165 μ M) と算出された。一方、CYP2C9 による酵素反応に対しては、10–300 μ M の濃度範囲で有意に酵素活性を増強することが示され、allicin は 3–30 μ M の濃度で用量依存的に代謝物の生成を促進し、その作用は 100–300 μ M の濃度で頭打ちとなった。また、CYP2C19 による酵素反応に対しては、3–30 μ M の濃度では有意に代謝物の生成を促進し、その作用は 10 μ M で最大に達し、100–300 μ M では逆に用量依存的に抑制するという相反する 2 相性の作用を示した。

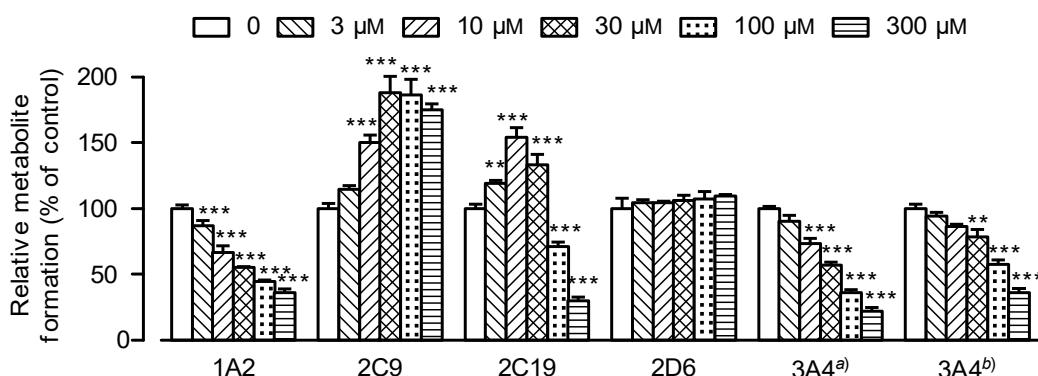


Fig. 35 Inhibition and enhancement effects of allicin on five human CYP isoform-catalyzed reactions in HLM. Probe substrates for five isoforms (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4) of human CYP were incubated with HLM in the presence of allicin at 1–300 μ M or not. The substrate metabolites formed were analyzed with LC-MS/MS. Data points represent mean \pm S.D. (n=3).

^aMidazolam 1'-hydroxylation. ^bTestosterone 6 β -hydroxylation.

Statistically significant differences, * P <0.01 and *** P <0.001 versus control.

次に、SAC、SMC、および SIPC の各アイソフォーム(CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4)の酵素活性に及ぼす影響を 0.01~1 mM の濃度範囲で検討した。SIPC は 1 mM の高濃度において、CYP3A4 による酵素反応(midazolam の 1'位水酸化反応)を有意に 31%阻害したが、SAC と SMC は測定した全ての CYP アイソフォームの酵素活性に対して、ほとんど影響を与えなかった (Fig. 36)

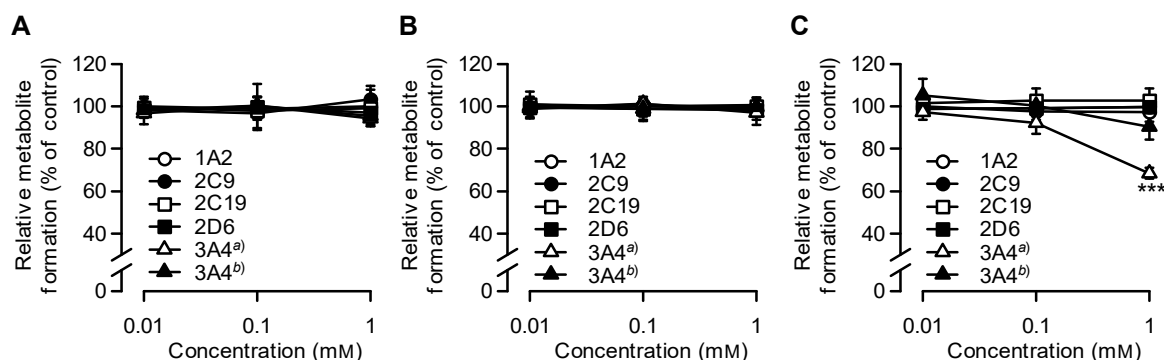


Fig. 36 Effects of SAC, SMC, and SIPC on five human CYP isoform-catalyzed reactions in HLM. Probe substrates for five isoforms (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4) of human CYP were incubated with HLM in the presence of SAC (A), SMC (B), and SIPC (C) at 0.01–1 mM or not. Each point represents mean \pm S.D. (n=3). ^aMidazolam 1'-hydroxylation. ^bTestosterone 6 β -hydroxylation.

Statistically significant differences, *** P <0.001 versus control.

一方、SAC、SMC、SIPC の N-アセチル化代謝物である NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC は、0.01 mM の濃度ではいずれの CYP アイソフォームの酵素活性に対しても影響を与えなかったが、0.1 mM と 1 mM の濃度では幾つかのアイソフォームによる酵素反応を有意に阻害した (Fig. 37)。NAc-SAC は CYP2D6 を除くアイソフォームの酵素活性には影響を与えなかったが、1 mM の濃度で CYP2D6 によ

る酵素反応を有意に 19%阻害した。NAc-SMC は CYP1A2 による反応を 0.1 mM と 1 mM の濃度で用量依存的に阻害し、1 mM での阻害率は 26%であった。また、NAc-S1PC は 1mM の濃度で CYP1A2、2D6、および 3A4(midazolam の 1'位水酸化)による酵素反応をそれぞれ、有意に 27%、19%、および 20%阻害し、CYP2C19 による酵素反応に対しては、0.1 mM と 1 mM の濃度で用量依存的に阻害し、1 mM での阻害率は 49%であった。

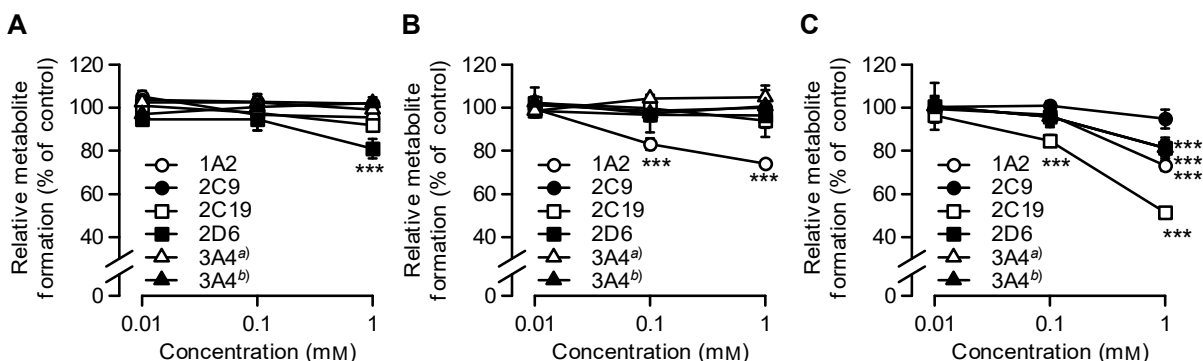


Fig. 37 Effects of *N*-acetylated metabolites of SAC, SMC, and S1PC on five human CYP isoform-catalyzed reactions in HLM. Probe substrates for five isoforms (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4) of human CYP were incubated with HLM in the presence of NAc-SAC (A), NAc-SMC (B), and NAc-S1PC (C) at 0.01–1 mM or not. Each point represents mean \pm S.D. (n=3). ^aMidazolam 1'-hydroxylation. ^bTestosterone 6 β -hydroxylation. Statistically significant differences, ***P<0.001 versus control.

さらに、SAC、SMC、S1PC の N-アセチル化/S-酸化代謝物である NAc-SACS、NAc-SMCS、NAc-S1PCS の CYP 酵素活性に及ぼす影響を検討した。これらの代謝物は 0.01~1 mM の濃度で 5 つのアイソフォームによる酵素反応に対してほとんど影響を与えず、NAc-S1PCS のみが 1 mM の高濃度で CYP2D6 による酵素反応を有意に 26%阻害した(Fig. 38)。

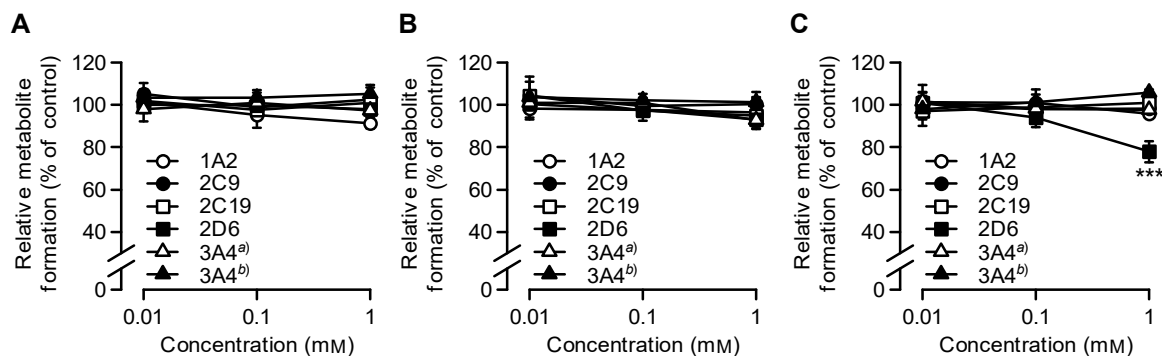


Fig. 38 Effects of *N*-acetylated/S-oxidized metabolites of SAC, SMC, and S1PC on five human CYP isoform-catalyzed reactions in HLM. Probe substrates for five isoforms (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4) of human CYP were incubated with HLM in the presence of NAc-SACS (A), NAc-SMCS (B), and NAc-S1PCS (C) at 0.01–1 mM or not. Each point represents mean \pm S.D. (n=3). ^aMidazolam 1'-hydroxylation. ^bTestosterone 6 β -hydroxylation. Statistically significant differences, ***P<0.001 versus control.

以上のように、SAC、SMC、SIPC とその N-アセチル化/S-酸化代謝物 (NAc-SACS、NAc-SMCS、NAc-SIPCS) は CYP の主要な 5 つのアイソフォーム (CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) の酵素活性に対して、SIPC と NAc-SIPCS が高濃度 (1 mM) で、それぞれ CYP3A4 (midazolam の 1' 位水酸化反応) と CYP2D6 を阻害した以外は、影響を与えなかった。一方、3 化合物の N-アセチル化代謝物 (NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC) は、0.1 と 1 mM の濃度において、幾つかの CYP アイソフォームに対して軽度から中程度 (19~49%) の阻害活性を示した。

第3節 考察

本章では、SAC、SMC、SIPC とその N-アセチル化代謝物、N-アセチル化/S-酸化代謝物のヒト CYP の酵素活性に及ぼす影響を *in vitro* 評価系を用いて検討した。ヒト肝ミクロソームとプローブ基質を用いた系を採用し、それぞれの化合物が、CYP の主要なアイソフォーム (CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) による酵素反応 (プローブ基質の代謝) に及ぼす影響を明らかにした。

最初に、各 CYP アイソフォームの酵素活性を測定するための反応条件 (プローブ基質の濃度、ヒト肝ミクロソームの蛋白濃度、反応時間) を決定し、その反応条件下で測定した既知阻害剤の IC_{50} 値が、これまでに報告された値^{77,84,88-91)}と同程度であることを確認した (Table 27)。一方、生ニンニク成分である allicin の CYP 阻害活性を測定したところ、一部のアイソフォームに対しては、これまでの報告とは異なる結果が得られた (Fig. 35)。Zou ら⁹⁶⁾は CYP 発現系と人工基質を用いた試験系において、allicin が 5 つの CYP アイソフォーム (CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) による代謝反応を濃度依存的に阻害することを報告している。本研究においても、allicin の CYP1A2 と CYP3A4 に対する濃度依存的な阻害活性を確認できたが、CYP2C9 による diclofenac の 4' 位水酸化反応においては、allicin が濃度依存的に代謝物の生成を増加させることが示された。さらに、CYP2C19 による *S*-mephenytoin の 4' 位水酸化反応においては、allicin が低濃度 (3~30 μ M) では反応を促進し、高濃度 (100~300 μ M) では逆に阻害するという 2 相性の影響を及ぼすことが示された。本研究と Zou ら⁹⁶⁾の研究の実験条件を比べると、酵素源 (肝ミクロソームと CYP 発現系) と基質 (医薬品と人工基質) に加えて、 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH) の供給源が異なることが分かった。即ち、Zou ら⁹⁶⁾は CYP の酵素反応に必須である NADPH の供給を、反応液中への NADPH 生成系 (NADP⁺、glucose-6-phosphate、glucose-6-phosphate dehydrogenase) の添加によって行ったのに対し、本研究では NADPH そのものを反応液中に添加した。仮に、allicin が glucose-6-phosphate dehydrogenase を阻害した場合、CYP による代謝反応の全てが抑制されることに繋がり、このことは評価された全ての CYP アイソフォームの代謝反応を allicin が阻害したとする Zou ら⁹⁶⁾の結果と整合する。その一方で、本研究で観察されたように、特定の化学物質が CYP の代謝反応を促進するという例が報告されている⁹⁷⁻⁹⁹⁾。例え

ば、CYP2C9 による非ステロイド性抗炎症薬 (flurbiprofen、naproxen、piroxicam) の水酸化が dapsone (diaminodiphenyl sulfone) の共存下で促進されること⁹⁷⁾、あるいは CYP3A4 による非ステロイド性抗炎症薬 diclofenac の 5 位水酸化が quinidine によって促進されることが報告されている⁹⁸⁾。酵素反応の速度論的な解析から、dapsone と quinidine は基質である非ステロイド抗炎症薬の K_m に影響を与えることなく、それぞれ、CYP2C9 と CYP3A4 の活性中心に基質とは異なる部位に結合し、アロステリックに V_{max} のみを増加させるという two-site binding model が提唱されている。

本研究において、SAC、SMC、SIPC は 0.01~1 mM の濃度範囲で、CYP3A4 を含む 5 つの CYP アイソフォームの代謝反応に対してほとんど影響を与えないことが示された (Fig. 36)。一方、Greenblatt ら¹⁰⁰⁾ は SAC と SMC が 0.1 mM の濃度において、ともに CYP3A4 による代謝反応を 50% 以上阻害することを報告している。CYP3A4 は小腸や肝臓に多く発現し、医薬品の 50% 以上の代謝に関与することから^{101,102)}、最も重要な CYP アイソフォームの一つであると考えられている。また、CYP3A4 は様々な構造を有する化合物の代謝に関与することから、その酵素活性に及ぼす影響を評価する場合には、異なる構造グループに由来する 2 つ以上のプローブ基質を用いることが推奨されている^{103,104)}。これに従い、本研究では midazolam と testosterone という最も汎用されている 2 つのプローブ基質を用いて CYP3A4 に対する影響を検討したのに対して、Greenblatt ら¹⁰⁰⁾ は triazolam のみを用いていた。しかし、Kenworthy ら¹⁰³⁾ は様々な CYP3A4 阻害剤の midazolam と triazolam の代謝に対する阻害活性を測定し、各阻害剤の両代謝反応に対する阻害の程度が良く相関することを報告している。従って、Greenblatt ら¹⁰⁰⁾ の研究と本研究の間で認められた、SAC と SMC の CYP3A4 に対する阻害活性の強さの違いは、それぞれの研究で異なるプローブ基質を用いたことに起因するとは考え難い。ただし、Greenblatt ら¹⁰⁰⁾ の研究では SMC の阻害作用が 0.1 mM の 1 濃度のみで評価されていることから、阻害作用の用量依存性が確認されておらず、結果の解釈には注意が必要である。また、SAC の作用は 0.025~0.4 mM の濃度範囲で検討されているが、各濃度における阻害の程度に差がほとんど認められず、通常とは異なる阻害様式が観察されている。以上のように、Greenblatt ら¹⁰⁰⁾ の試験条件や研究結果には不十分で不明な点があるものの、本研究との間の結果の違いを説明できる理由は得られていない。そこで、SAC と SMC の CYP3A4 酵素活性に及ぼす影響を阻害活性の強さと臨床血中濃度 (推定値) との関係から考察することにした。Kodera ら¹⁰⁵⁾ は SAC のヒト体内動態を予備的に検討しており、AGE の経口摂取後、SAC の最高血漿中濃度は約 140 nM であることを報告している。また、Nagae ら²⁰⁾ はラットにおける SAC の組織への移行性を検討しており、SAC の肝臓中濃度は血漿中濃度の 2 倍以上となることを報告している。また、AGE 中の SAC の含量は SIPC と同程度であるのに対し、SMC の含量は SAC や SIPC よりも少ない。これらのことから、AGE の摂取後、水溶性イオウ化合物 (SAC、SMC、SIPC) の肝臓中濃度はいずれも 280 nM 以下となることが推測され、この濃度は Greenblatt ら¹⁰⁰⁾ の試験

濃度 (0.1 mM) と比べても著しく低い値である。以上のことから、本研究と Greenblatt ら¹⁰⁰⁾の研究の間で異なる結果が得られた理由は不明のままであるが、AGE 摂取後に SAC と SMC、加えて SIPC が CYP3A4 の酵素活性に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

第 I~第 III 章の研究で、SAC、SMC、SIPC はラットやイヌにおいて程度に差はあるものの、肝臓や腎臓で N-アセチル化や S-酸化を受けることが示された。SAC と SIPC の主要な消失経路が N-アセチル化代謝であるのに対し、SMC は N-アセチル化をほとんど受けないことが示された。そこで、本研究では、SAC、SMC、SIPC の N-アセチル化代謝物と N-アセチル化/S-酸化代謝物についても CYP 酵素活性に及ぼす影響を検討した。その結果、N-アセチル化代謝物である NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC は 1 mM の高濃度において、幾つかのアイソフォームによる代謝反応を阻害したが、その阻害の程度(阻害率)は 50%未満であることが示された (Fig. 37)。第 I~第 III 章での肝臓と腎臓の S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験の結果で明らかにされたように、SAC、SMC、SIPC の N-アセチル化代謝は、ラットやイヌと比べてヒトでは起こり難いことが示されており、3 化合物の N-アセチル化代謝物の血中や肝臓中の濃度は未変化体と比べて著しく低くなることが推測される。これらの点を考え合わせると、SAC、SMC、SIPC の N-アセチル化代謝物についても臨床で CYP 酵素活性に影響を与える可能性は極めて低いと考えられた。一方、N-アセチル化/S-酸化代謝物である NAc-SACS、NAc-SMCS、NAc-SIPCS は 1 mM の高濃度においても CYP 酵素活性にほとんど影響を与えないことから (Fig. 38)、やはり、臨床で CYP 酵素活性に影響を与える可能性は極めて低いと考えられる。

本研究では、AGE の経口活性成分である SAC、SMC、SIPC に加えて、AGE のヒト CYP 酵素活性に及ぼす影響についても検討した。植物薬の影響を *in vitro* で調べる場合の大きな課題の一つは、適切な試験濃度を設定することである。Foster ら¹⁰⁶⁾は 10 のニンニク製剤の CYP 阻害活性を報告しているが、製剤の試験濃度が高く、*in vitro* 結果からの *in vivo* の予測を困難にしている。この課題に対して、Strandell ら¹⁰⁷⁾は植物療法薬の CYP 阻害活性の指標として、植物薬の推奨用量を阻害活性 (IC₅₀ 値) で割った値 (volume) を用いることを提唱している。即ち、植物薬の推奨用量を *in vitro* 試験で得られた IC₅₀ 値で割ることで、IC₅₀ 値の濃度を調製するために必要な volume を算出し、その volume がヒト血液量である 4L より大きい場合は更に詳細な評価を行うことを提案している。本検討において AGE の CYP 酵素活性に与える影響を予備的に調べたところ、0.01~0.3 mg material/mL の濃度範囲ではいずれの CYP アイソフォームに対しても有意な阻害活性を示さず、AGE1 日服用量 (0.3~0.6 g material) を IC₅₀ 値で割った値は 2L 未満になると推測された。

以上の研究結果と考察から、SAC、SMC、SIPC とその代謝物の CYP 阻害活性は非常に弱く (IC₅₀ > 1 mM)、これらの化合物が CYP 阻害に基づく薬物相互作用を引き起こす可能性は極めて低いと結論した。

結論

本研究では AGE の主要な水溶性イオウ化合物である SAC、SMC、および SIPC の体内挙動を明らかにするために、*in vivo* と *in vitro* で種々の検討を行った。SAC のラットとイヌにおける代謝、排泄、および血中動態の各試験を *in vivo* で実施し、SAC の動態特性に加えて、その代謝物の種類と代謝様式、および代謝経路の全容を明らかにすることに成功した。また、SAC が主に N-アセチル化代謝によって消失するという研究結果にもとづき、SMC と SIPC の N-アセチル化代謝、排泄、および血中動態についても研究を行い、その動態特性を明らかにした。さらに、SAC、SMC、SIPC の N-アセチル化代謝を担う臓器とその代謝活性、および代謝の種差を明らかにするために、肝臓と腎臓の S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験を実施した。最後に、ヒト肝ミクロソームとプローブ基質を用いた CYP 代謝試験を行い、SAC、SMC、SIPC、およびその N-アセチル化代謝物と N-アセチル化/S-酸化代謝物が臨床で CYP の酵素活性に影響を与える可能性は極めて低いことを示した。本研究を通じて、以下の結論を得た。

1. SAC、SMC、SIPC はいずれも経口吸収性に優れ、投与量の約 90%以上が消化管から吸収される。また、いずれの化合物も腎臓で再吸収を受けるために尿中にはほとんど排泄されず、特にイヌにおいては血中濃度が持続し、消失半減期(5~12 時間)が非常に長い。
 2. SAC、SIPC、SMC は主に代謝によって体内から消失するが、その主要な代謝経路は異なる。SAC と SIPC は主に N-アセチル化と S-酸化を受け、N-アセチル化代謝物、S-酸化代謝物、および N-アセチル化/S-酸化代謝物へと代謝される。一方、SMC は N-アセチル化を受け難く、N-アセチル化代謝物の血中濃度は SMC と比べて極めて低い。
 3. 肝臓と腎臓が N-アセチル化代謝を担う臓器である。肝臓と腎臓の S9 画分を用いた N-アセチル化と脱アセチル化の *in vitro* 代謝試験の結果は、SAC、SMC、および SIPC の *in vivo* 試験の結果に良く反映されている。また、SAC、SIPC の N-アセチル化活性と NAc-SAC、NAc-SIPC の脱アセチル化活性の優位性には種差があり、ラットやイヌとも異なり、ヒトでは肝臓、腎臓ともに脱アセチル化が優位である。
 4. SAC と SIPC の N-アセチル化代謝物 (NAc-SAC と NAc-SIPC) の尿中排泄は、ラットとイヌで大きく異なる。ラットでは投与された SAC と SIPC の大部分は N-アセチル化代謝物として尿中へ排泄されるのに対し、イヌでは N-アセチル化代謝物の尿中排泄率は投与量の 1%未満である。
- 4-1. ラットにおける *in vitro* 代謝試験と *in vivo* 腎クリアランスの解析結果から、肝臓と腎臓は N-アセチル

ル化が脱アセチル化よりも優位であり、NAc-SACとNAc-SIPCは尿中に能動的に分泌されることが示唆された。このことから、ラットにおいては、SACとSIPCは腎臓での再吸収を介して全身を再循環し、最終的には肝臓や腎臓でN-アセチル化された後、尿中へ分泌されることが考えられた。

4-2. *In vitro* 代謝試験の結果から、イヌの腎臓は強力な脱アセチル化活性を有することが示され、SACとSIPCのN-アセチル化代謝物は腎排泄過程でそのほとんどが未変化体へ代謝されている可能性が示された。その結果として、投与されたSACとSIPCの大部分は未変化体として腎臓での再吸収を介して全身を再循環することになり、その血中濃度は持続するものと考えられた。

5. SAC、SMC、SIPCとそのN-アセチル化代謝物およびN-アセチル化/S-酸化代謝物のヒトCYP阻害活性は非常に弱い($IC_{50} > 1 \text{ mM}$)。 *In vitro* 代謝実験の結果とヒトで予想される血中濃度の考察から、これらのAGE中の主要な水溶性イオウ化合物がCYP阻害に基づく薬物相互作用を引き起こす可能性は極めて低いと考えられた。

本研究において、AGE中の主要な水溶性イオウ化合物であるSAC、SMC、SIPCの体内動態は、優れた経口吸収性と腎臓での再吸収によって特徴付けられ、SACとSIPCの体内動態は極めて類似していることを明らかにした。また、そのN-アセチル化代謝は肝臓と腎臓が担い、N-アセチル化代謝物生成の程度は両臓器におけるN-アセチル化と脱アセチル化の活性比率によって決定されることも明示した。さらに、腎臓はSACとSIPCの排泄過程で重要な役割を果たし、ラットにおいては、再吸収されるSACとSIPCをそれぞれ、能動的に分泌されるNAc-SAC、NAc-SIPCへと代謝することで血中からの消失を速め、イヌにおいては逆にNAc-SACとNAc-SIPCをそれぞれ、再吸収されるSAC、SIPCへと代謝することで消失を遅延させるなど、SACとSIPCの血中濃度の持続に大きく影響を及ぼすものと思われた。さらに、N-アセチル化代謝には種差があり、ヒトではN-アセチル化代謝物が生成され難いものと推定できた。

以上、SAC、SMCおよびSIPCのAGE中主要3成分のラットおよびイヌにおける体内動態を明らかにすることができた。得られた成果は、今後、これら3成分についてのヒトにおける体内動態研究実施に向けて重要な基礎的知見となると考える。また、3成分のヒトCYP酵素活性に与える影響は、AGE服用時に想定される血中濃度下では、ほとんど無視できる程度であることが示されたことから、臨床試験において、CYP阻害に関する薬物相互作用の有無を調べる必要はないと考える。さらに、本研究において用いた手法と得られた成果は他のcysteine-S-conjugateの体内動態研究へも応用可能であり、cysteine-S-conjugateの体内動態の全容解明に寄与するものとする。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始御懇篤なる御指導並びにご鞭撻を賜りました岡山大学薬学部 生物薬剤学教室 檜垣和孝 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本論文を作成するにあたり、有益なる御指導、ご鞭撻を賜りました岡山大学薬学部 生物薬剤学教室 大河原賢一 准教授に心より感謝致します。

本研究は湧永製薬株式会社創薬研究所にて行われたものであり、研究の機会を与えてくださった湧永製薬株式会社 湧永寛仁 社長、湧永寛信 副社長、ならびに田村浩一 創薬研究所所長に厚く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、御指導、御助言を賜りました湧永製薬株式会社 岡孝己 研究顧問に深く感謝致します。また、本研究にご協力頂いた創薬研究所の小寺幸広 博士、伊藤健治および風盛大地の諸氏に感謝致します。

最後に、本研究を行うにあたり常に励まし、協力し続けてくれた家族に心から感謝します。

実験の部

第Ⅰ-Ⅲ章 実験の部

【1】 試薬

LC-MS 用 formic acid、phosphate buffer、phosphate buffered saline は和光純薬工業株式会社より、LC-MS 用 acetonitrile と methanol は関東化学工業株式会社より購入した。Acetyl-CoA と LC-MS 用 pentadecafluorooctanoic acid は東京化成工業株式会社より購入した。ラット(SD 系雄性)、イヌ(ビーグル系雄性)、ヒト(男女混合)の肝臓と腎臓の S9 画分は XenoTech 社より購入した。注射用蒸留水は株式会社大塚製薬工場より、注射用生理食塩水は扶桑薬品工業株式会社より購入した。

【2】 化合物

SAC と SMC は東京化成工業株式会社より購入した。NAc-SAC、NAc-SACS、NAc-SMC、NAc-SMCS、NAc-SIPC、NAc-SIPCS、SACS、SIPC、GSAC、S-butenyl-L-cysteine (SBC) は前報に従って合成した^{22,108,109}。

【3】 実験動物

SD 系雄性ラット(230~280 g)は日本チャールズリバー株式会社より購入した。ビーグル系雄性イヌ(10~14 kg)は北山ラベス株式会社より購入した。湧永製薬動物実験委員会で承認された実験計画書に基づいて動物実験を実施した。

【4】 被験化合物の投与液調製

水溶性イオウ化合物(SAC、SMC、SIPC、NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC、NAc-SACS、NAc-SMCS、NAc-SIPCS、SACS)を注射用蒸留水、あるいは注射用生理食塩水に溶解し、それぞれを経口投与と静脈内投与に供した。

【5】 動物実験

(1) ラット排泄試験

SD 系雄性ラット(230~280 g)を一晩(16~20 時間)絶食させた。ラットに被験化合物を経口投与(5 mL/kg)、あるいは静脈内投与(2 mL/kg)した後、代謝ケージ(夏目製作所株式会社)に個別に收容し、投与 24 時間後までに排出された尿を採取した。また、エーテル麻酔下で、ラットの総胆管にポリエチレンチューブ(SP-10、夏目製作所株式会社)を挿入し、固定した。覚醒後、ラットに被験化合物を経口投与(5 mL/kg)、あるいは静脈内投与(2 mL/kg)した後、ボールマンケージ(夏目製作所株式会社)に個別に收容し、投与 24 時間後までに排出された胆汁を採取した。

尿、および胆汁のサンプルはLC-MS/MS分析の直前まで-30℃で保存した。尿中、および胆汁中への排泄率は排泄量を投与量で除することによって算出した(モル換算)。

(2) ラット体内動態試験

エーテル麻酔下で、SD 系雄性ラット(230~280 g)の左大腿静脈よりポリエチレンチューブ(SP-31、夏目製作所株式会社)を挿入し、その先端が腹部大静脈に達する位置で固定した。反対側のチューブ先端を頸背部より出して固定し、チューブ内はヘパリン生理食塩水(ヘパリン、持田製薬株式会社、生理食塩水で 100 units/mL に希釈)で満たした。一晚(16~20 時間)絶食後、ラットに被験化合物を経口投与(5 mL/kg)、あるいは静脈内投与(2 mL/kg)し、投与後 5 分、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10 時間の各時点でチューブより 0.2~0.3 mL の血液を、1 µL のヘパリン溶液(1000 units/mL)を含むシリンジを用いて採取し、直ちに氷冷した。採血後、チューブ内を生理食塩水で満たし、チューブ内での血液凝固を防いだ。4℃ 下で血液サンプルを遠心して血漿サンプルを調製し、LC-MS/MS 分析の直前まで-30℃で保存した。

(3) イヌ体内動態試験

一晚(16~20 時間)絶食後、ビーグル系雄性イヌ(10~14 kg)に被験化合物を経口投与(1 mL/kg)、あるいは静脈内投与(0.5 mL/kg)し、投与後 5 分、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、36、48 時間の各時点で橈側皮静脈より 0.5~1.0 mL の血液を、5 µL のヘパリン溶液(1000 units/mL)を含むシリンジを用いて採取し、直ちに氷冷した。4℃ 下で血液サンプルを遠心して血漿サンプルを調製した。また、飼育ケージの下底に採尿用トレイを置き、投与後 0~24 時間と 24~48 時間の 2 回に分けて尿を採取した。尿、および血漿のサンプルは LC-MS/MS 分析の直前まで-30℃で保存した。尿中への排泄率は排泄量を投与量で除することによって算出した(モル換算)。

【6】 血漿、尿、および胆汁サンプルの定量分析

検量線溶液は無処置動物からの血漿、尿、および胆汁を用いてそれぞれ作成した。検量線溶液、あるいは生体試料サンプル(血漿、尿、胆汁)の一定量(80~100 µL)に 1 mL の LC-MS 用 methanol と内部標準化合物 SBC(20 µg/mL、4µL)を加えて良く混合した。遠心後、上清の約 0.9 mL を減圧濃縮した後、残渣を 0.3 mL の LC 移動相 A(0.1% pentadecafluorooctanoic acid(W/V)、0.1% formic acid(V/V)含有 99.5% ミリ Q 水/0.5% acetonitrile(V/V))に溶解した。遠心上清を LC-MS/MS で測定・分析した。

【7】 LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS 分析装置は Premier XE タンデム型質量分析計と ACQUITY UPLC 超高速液体クロマトグラフ (ともに Waters Corporation 社)で構成された。クロマト分離は ACQUITY UPLC C18 BEH カラム(2.1 × 50 mm, 1.7 µm; Waters Corporation 社)を用い、以下の条件で実施した。

カラム温度, 45°C; 流速, 0.8 mL/min; 移動相, LC 移動相 A と LC 移動相 B (0.1% pentadecafluorooctanoic acid (W/V), 0.1% formic acid (V/V) 含有 10% ミリ Q 水/90% acetonitrile (V/V)); 直線グラジエント分析, LC 移動相 B 0.1%→2% (0~0.5 min), 2%→20% (0.5~2.0 min), 20%→40% (2.0~4.0 min), 40%→99.9% (4.0~4.5 min), 0.1% (4.5~10 min)。

質量分析はエレクトロスプレーイオン化法 (capillary voltage 0.5kV, source temperature 150°C, desolvation gas temperature 400°C, desolvation gas flow と cone gas flow はそれぞれ 1000 L/h と 50 L/h) でイオン化し、positive mode で測定した。また、化合物の定量は multi reaction monitoring (MRM) モードを用いて行った (Table 28)。

Table 28 MS/MS condition of SAC, SMC, SIPC, and their metabolites.

Compound	MRM	Cone energy (V)	Colision energy (V)
SAC, SIPC	162.1 → 145.1	15	10
SMC	136.1 → 119.1	15	10
SACS	178.1 → 88.1	15	10
NAc-SAC, NAc-SIPC	204.1 → 162.1	15	10
NAc-SMC	178.1 → 136.1	15	10
NAc-SACS, NAc-SIPCS	220.1 → 130.1	15	10
NAc-SMCS	194.1 → 130.1	15	10
SBC	176.1 → 159.1	15	10
GSAC	291.1 → 145.1	15	15

【8】薬物動態解析

体内動態パラメータは WinNonlin ソフトウェア (version 2.1, Pharsight 社)、あるいは MS Excel ソフト¹¹⁰⁾ を用いてモデル非依存的解析法にて算出した。最高血漿中濃度 (C_{max}) とその到達時間 (t_{max}) は実験データから直接、決定した。消失速度定数 (λ_z) は対数血漿中濃度-時間プロットの終末消失相を線形最小二乗法による解析を行って決定し、消失半減期 ($t_{1/2}$) は $\ln 2/\lambda_z$ より算出した。血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は台形法にて算出した。バイオアベイラビリティ (Bioavailability)、全身クリアランス (CL_{tot})、腎クリアランス (CL_r) は以下の式を用いて算出した。

Bioavailability = AUC (oral)/AUC (i.v.), CL_{tot} = Dose (i.v.)/AUC (i.v.), CL_r = Ae/AUC (Ae, 尿中排泄量; Dose, 投与量; oral, 経口投与; i.v., 静脈内投与)。

【9】血漿中非結合型率 (f_{up}) の測定

SAC, SMC, SIPC およびその代謝物の f_{up} は市販の装置 (Prod#89809, Thermo Fisher Scientific 社) を用い、平衡透析法にて測定した。ラットとイヌの血漿は無処置動物の血液より調整した。被験化合物 (1 あるいは 3 $\mu\text{g/mL}$) を含む血漿の 200 μL を透析膜チャンバーに添加し、phosphate buffered saline の 350 μL を緩衝液チャンバー加えた。4 時間、振とうした (37°C, 200 rpm) 後、透析膜チャンバー (結合型

濃度+非結合型濃度)と緩衝液チャンバー(非結合型濃度)から 50 μL を採取し、それぞれに対して 50 μL の phosphate buffered saline とコントロール血漿を加えた。尚、NAc-SMC と NAc-SMCS の f_{up} を測定する場合は、4°C で 16 時間、振とうした。さらに、1 mL の LC-MS 用 methanol と内部標準化合物 SBC (20 $\mu\text{g/mL}$, 4 μL) を加えて良く混合した。遠心後、上清の約 0.9 mL を減圧濃縮した後、残渣を 0.3 mL の LC 移動相 A に溶解した。上記【7】に記載された方法に従って、遠心上清を LC-MS/MS にて測定・分析した。

f_{up} は以下の式より算出した。

$f_{up} = \text{緩衝液チャンバー中の化合物濃度} / \text{透析膜チャンバー中の化合物濃度}$

【10】 *In vitro* 代謝試験

ラット(SD系雄性)、イヌ(ビーグル系雄性)、ヒト(男女混合)の肝臓と腎臓のS9画分を用いた。SAC、SMC、S1PC、SACSのN-アセチル化代謝の反応溶液(0.1 mL)は、0.1M phosphate buffer (pH7.4)、5 μM のSAC、SMC、S1PC、あるいはSACS、2 mM のacetyl-CoA、およびラット、イヌ、あるいはヒトのS9画分(0.125~1 mg protein/mL)で構成された。37°C で 5 分間のプレインキュベーションを行った後、acetyl-CoA 添加によって反応を開始し、さらに 37°C で 10~240 分間(n=3)、インキュベートした。NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-S1PC、NAc-SACS の脱アセチル代謝の反応溶液(0.1 mL)は、0.1M phosphate buffer (pH7.4)、5 μM のNAc-SAC、NAc-SMC、NAc-S1PC、あるいはNAc-SACS、およびラット、イヌ、あるいはヒトのS9画分(0.025~1 mg protein/mL)で構成された。37°C で 5 分間のプリインキュベーションを行った後、イオウ化合物添加によって反応を開始し、さらに 37°C で 5~120 分間(n=3)、インキュベートした。1 mL の LC-MS 用 methanol を加えて反応を停止し、内部標準化合物 SBC (20 $\mu\text{g/mL}$, 4 μL) を加えて良く混和した。遠心後、上清の約 0.9 mL を減圧濃縮した後、残渣を 0.3 mL の LC 移動相 A に溶解した。上記【7】に記載された方法に従って、遠心上清を LC-MS/MS にて測定・分析した。

【11】 固有クリアランス(CL_{int})の算出

NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-S1PC、NAc-SACS の脱アセチル代謝の固有クリアランス($CL_{int, deacetylation}$)は *in vitro* half-life 法¹¹⁾に従い、以下のように算出した。NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-S1PC、あるいはNAc-SACSの残存濃度の自然対数値を種々の反応時間(分)に対してプロットし、線形最小二乗法による解析を行い、得られた直線の slope を用いて次式より求めた。

$$CL_{int, deacetylation} (\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}) = \text{slope} (\text{min}^{-1}) / \text{S9 protein concentration (mg protein/mL)} \times 1000$$

SAC、SMC、S1PC、SACS の N-アセチル化代謝の固有クリアランス($CL_{int, acetylation}$)は以下のように算出した。NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-S1PC、あるいはNAc-SACSの生成濃度を種々の反応時間に対

してプロットし、非線形最小二乗法による解析を行い、次式より求めた。

$$C_t = A/a \times (1 - \exp^{-at})$$

$$a = P \times (CL_{int, acetylation} + CL_{int, deacetylation}), A/a = S_0 \times \frac{CL_{int, acetylation}}{CL_{int, acetylation} + CL_{int, deacetylation}}$$

$$CL_{int, acetylation} = A/a \times \frac{CL_{int, deacetylation}}{(S_0 - A/a)}$$

(P は反応液中の蛋白濃度を、 S_0 と C_t はそれぞれ、イオウ化合物の初期濃度と反応時間 t における N-アセチル化代謝物の濃度を、 $CL_{int, acetylation}$ と $CL_{int, deacetylation}$ はそれぞれ、N-アセチル化反応の CL_{int} と脱アセチル化反応の CL_{int})

線形最小二乗法と非線形最小二乗法による解析は、解析ソフト (Kyplot ver. 5.0, Keyence 社) を用いて行った。

第 IV 章 実験の部

【1】試薬

LC-MS 用 formic acid、magnesium chloride、phosphate buffer、dextromethorphan、phenacetin は和光純薬工業株式会社より、LC-MS 用 acetonitrile と methanol は関東化学工業株式会社より購入した。Dextrophan は MP Biomedicals 社より、midazolam は BD Biosciences 社より、propranolol と LC-MS 用 pentadecafluorooctanoic acid は東京化成工業株式会社より購入した。Acetaminophen、diclofenac、fura-fylline、4'-hydroxydiclofenac、4'-hydroxymephenytoin、1'-hydroxymidazolam、6 β -hydroxy-testosterone、ketoconazole、S-mephenytoin、quinidine、sulfaphenazole、testosterone、ticlopidine は Sigma-Aldrich 社より購入した。Allicin は LKT laboratories 社より、NADPH はオリエンタル酵母工業株式会社より購入した、ヒト肝臓ミクロソームは XenoTech 社より購入した。

【2】化合物

SAC と SMC は東京化成工業株式会社より購入した。NAc-SAC、NAc-SACS、NAc-SMC、NAc-SMCS、NAc-SIPC、NAc-SIPCS、SIPC、SBC は前報に従って合成した^{22,108,109)}。

【3】ヒト CYP 酵素活性に及ぼす影響

ヒト肝ミクロソームにおける CYP1A2、2C9、2C19、2D6、および 3A4 に特異的な代謝反応に及ぼす水溶性イオウ化合物 (SAC、SMC、SIPC、NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC、NAc-SACS、NAc-SMCS、NAc-SIPCS)、および allicin の影響を調べた。

各 CYP アイソフォームに特異的な代謝反応の反応条件 (プローブ基質とその濃度、プローブ基質の

代謝物、反応時間、ヒト肝ミクロソームの蛋白濃度)を Table 29 に示す。反応溶液(0.1 mL)は、0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)、5 mM magnesium chloride、5 mM NADPH、各 CYP アイソフォームのプローブ基質(K_m 値付近の濃度)、ヒト肝ミクロソーム(0.05~0.4 mg protein/mL)、およびイオウ化合物(0.003~1 mM)あるいは既知阻害剤で構成された。水溶性イオウ化合物は 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)に溶解し、allicin(10 mg/mL)は蒸留水で希釈した。プローブ基質と阻害剤は dimethyl sulfoxide に溶解し、反応溶液中の dimethyl sulfoxide 濃度は 0.2%(V/V) 未満とした。37°C で 5 分間のプレインキュベーションを行った後、NADPH 添加によって反応を開始し、さらに 37°C で 15~90 分間(n=3)インキュベートした。1 mL の LC-MS 用 acetonitrile を加えて反応を停止し、内部標準化合物 propranol (50 µM、4 µL)を加えて良く混和した。遠心後、上清の約 0.9mL を減圧濃縮した後、残渣を 0.3mL の LC 移動相 A (0.1% formic acid(V/V) 含有 90% ミリ Q 水/10% acetonitrile (V/V))に溶解した。遠心上清を LC-MS/MS を用いて測定・分析した。IC₅₀ は解析ソフト(Kyplot ver. 5.0, Keyence 社)を用いて非線形最小二乗法にて解析し、算出した。

Table 29 Human CYP isoforms, probe substrates, metabolites analyzed, incubation time, and protein concentrationsof HLM.

Isoform	Substrate	Conc.	Metabolite	Incubation	HLM
CYP		µM		min	mg/mL
1A2	Phenacetin	40	Acetaminophen	40	0.2
2C9	Diclofenac	10	4'-Hydroxydiclofenac	15	0.2
2C19	S-Mephenytoin	50	4'-Hydroxymephenytoin	90	0.4
2D6	Dextromethorphan	2	Dextrorphan	15	0.2
3A4	Midazolam	1	1'-Hydroxymidazolam	15	0.05
	Testosterone	40	6β-Hydroxytestosterone	15	0.05

HLM, human liver microsomes.

【4】 LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS 分析装置は Premier XE タンデム型質量分析計と ACQUITY UPLC 超高速液体クロマトグラフ (Waters Corporation 社) で構成された。クロマト分離は ACQUITY UPLC C18 BEH カラム(2.1 × 100 mm, 1.7 µm; Waters Corporation 社)を用い、以下の条件で実施した。

カラム温度, 40°C; 流速, 0.3 mL/min; 移動相, LC 移動相 A と LC 移動相 B (0.1% formic acid(V/V) 含有 acetonitrile); 直線グラジエント分析, LC 移動相 B 5%→95%(0~2.0 min)、95%(2.0~2.5 min)、5%(2.5~5 min)。質量分析はエレクトロスプレーイオン化法(capillary voltage 0.5kV、source temperature 120°C、desolvation gas temperature 350°C、desolvation gas flow と cone gas flow はそれぞれ 1000 L/h と 50 L/h)でイオン化し、positive mode で測定した。また、各プローブ基質の代謝物の定量は multi reaction monitoring (MRM)モードを用いて行った(Table 30)。

Table 30 MS/MS conditiona of probe substrate metabolites of five CYP isoforms.

Isoform	Metabolite	MRM	Cone enery (V)	Colision energy (V)
1A2	Acetaminophen	152.0 → 110.0	34	16
2C9	4'-Hydroxydiclofenac	311.8 → 231.0	22	22
2C19	4'-Hydroxymephenytoin	235.0 → 149.8	34	16
2D6	Dextrophan	258.3 → 157.0	46	34
3A4	1'-Hydroxymidazolam	341.9 → 323.9	40	22
3A4	6 β -Hydroxytestosterone	305.2 → 269.1	22	22
Internal	Propranolol	260.2 → 182.9	34	16

【5】 ヒト肝ミクロソームに対する代謝安定性

水溶性イオウ化合物 (SAC、SMC、SIPC、NAc-SAC、NAc-SMC、NAc-SIPC、NAc-SACS、NAc-SMCS、NAc-SIPCS) のヒト肝ミクロソームに対する代謝安定性を調べた。反応溶液 (0.1 mL) は、0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)、5 mM magnesium chloride、5 mM NADPH、0.01 mM の水溶性イオウ化合物、およびヒト肝ミクロソーム (0.2 mg protein/mL) で構成された。37°C で 5 分間のプレインキュベーションを行った後、水溶性イオウ化合物の添加によって反応を開始し、さらに 37°C で 15~90 分間 (n=3) インキュベートした。1 mL の LC-MS 用 methanol を加えて反応を停止し、内部標準化合物 SBC (20 μ g/mL、4 μ L) を加えて良く混和した。第 I-III 章 実験の部 【7】に記載された方法に従って LC-MS/MS にて測定・分析した。

【6】 統計処理

統計処理は解析ソフト (Kyplot ver. 5.0, Keyence 社) を用いて行った。Dunnett の多重比較検定によりコントロール群と化合物処置群の間の有意差を検定し、 $p < 0.01$ 以下を有意とした。

引用文献

- 1) Rivlin RS. Historical perspective on the use of garlic. *J. Nutr.*, **131**, 951S–954S (2001).
- 2) Kik C, Kahane R, Gebhardt R. Garlic and health. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **11**, 57S–65S (2001).
- 3) Koch HP and Lawson LD. Garlic: The Science and Therapeutic Application of *Allium Sativum* L. and Related Species. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 2nd edition (1996).
- 4) Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.*, **136**, 716S–725S (2006).
- 5) Welch C, Wuarin L, Sidell N. Antiproliferative effect of the garlic compound S-allylcysteine on human neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett.*, **63**, 211–219 (1992).
- 6) Nishino H, Iwashima A, Itakura Y, Matsuura H, Fuwa T. Antitumor-promoting activity of garlic extracts. *Oncology*, **46**, 277–280 (1989).
- 7) Liu J, Lin RI, Milner JA. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and DNA adducts by garlic powder. *Carcinogenesis*, **13**, 1847–1851 (1992).
- 8) Steiner M, Khan AH, Holbert D, Lin RI. A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**, 866–870 (1996).
- 9) Ried K, Frank OR, Stocks NP. Aged garlic extract lowers blood pressure in patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomized controlled trial. *Maturitas*, **67**, 144–150 (2010).
- 10) Budoff MJ, Ahmadi N, Gul KM, Liu ST, Flores FR, Tiano J, Takasu J, Miller E, Tsimikas S. Aged garlic extract supplemented with B vitamins, folic acid and L-arginine retards the progression of subclinical atherosclerosis: a randomized clinical trial. *Prev. Med.*, **49**, 101–107 (2009).
- 11) Nantz MP, Rowe CA, Muller CE, Creasy RA, Stanilka JM, Percival SS. Supplementation with aged garlic extract improves both NK and $\gamma\delta$ -T cell function and reduces the severity of cold and flu symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled nutrition intervention. *Clin. Nutr.*, **31**, 337–344 (2012).
- 12) Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.*, **131**, 955S–962S (2001).
- 13) Chu Q, Lee DT, Tsao SW, Wang X, Wong YC. S-allylcysteine, a water-soluble garlic derivative, suppresses the growth of a human androgen-independent prostate cancer xenograft, CWR22R, under in vivo conditions. *BJU. Int.*, **99**, 925–932 (2007).
- 14) Chuah SC, Moore PK, Zhu YZ. S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial

infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H2693–H2701 (2007).

- 15) Cruz C, Correa-Rotter R, Sánchez-González DJ, Hernández-Pando R, Maldonado PD, Martínez-Martínez CM, Medina-Campos ON, Tapia E, Aguilar D, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **293**, F1691–F1698 (2007).
- 16) Suzuki J, Yamaguchi T, Matsutomo T, Amano H, Morihara N, Kodera Y. S-1-Propenylcysteine promotes the differentiation of B cells into IgA-producing cells by the induction of Erk1/2-dependent Xbp1 expression in Peyer's patches. *Nutrition*, **32**, 884–889 (2016).
- 17) Nishikawa-Ogawa M, Wanibuchi H, Morimura K, Kinoshita A, Nishikawa T, Hayashi S, Yano Y, Fukushima S. N-acetylcysteine and S-methylcysteine inhibit MeIQx rat hepatocarcinogenesis in the post-initiation stage. *Carcinogenesis*, **27**, 982–988 (2006).
- 18) Hsu CC, Yen HF, Yin MC, Tsai CM, Hsieh CH. Five cysteine-containing compounds delay diabetic deterioration in Balb/cA mice. *J. Nutr.*, **134**, 3245–3249 (2004).
- 19) Wassef R, Haenold R, Hansel A, Brot N, Heinemann SH, Hoshi T. Methionine sulfoxide reductase A and a dietary supplement S-methyl-L-cysteine prevent Parkinson's-like symptoms. *J. Neurosci.*, **27**, 12808–12816 (2007).
- 20) Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y, Higashi Y. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med.*, **60**, 214–217 (1994).
- 21) Yan CK and Zeng FD. Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian J. Drug Metab. Pharmacok.*, **5**, 61–69 (2005).
- 22) Krause RJ, Glocke SC, Elfarra AA. Sulfoxides as urinary metabolites of S-allyl-L-cysteine in rats: evidence for the involvement of flavin-containing monooxygenases. *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 1137–1142 (2002).
- 23) Barnsley EA. The metabolism of S-methyl-L-cysteine in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 24–36 (1964).
- 24) Sklan NM and Barnsley EA. The metabolism of S-methyl-L-cysteine. *Biochem. J.*, **107**, 217–223 (1968).
- 25) Mitchell SC, Smith RL, Waring RH, Aldington GF. The metabolism of S-methyl-L-cysteine in man. *Xenobiotica*, **14**, 767–779 (1984).
- 26) Davies B and Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.*, **10**,

1093–1095 (1993).

- 27) Nishimuta H, Houston JB, Galetin A. Hepatic, intestinal, renal, and plasma hydrolysis of prodrugs in human, cynomolgus monkey, dog, and rat: implications for in vitro-in vivo extrapolation of clearance of prodrugs. *Drug Metab. Dispos.*, **42**, 1522–1531 (2014).
- 28) Tateishi M. Novel metabolic pathways of cysteine conjugate and its related metabolites. *Xenobio. Metabol. and Dispos.*, **16**, 104–114 (2001).
- 29) Ito K, Brown HS, Houston JB. Database analyses for the prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **57**, 473–486 (2004).
- 30) Lee S, Chang NI, Yoo M, Choi JH, Shin D. Development and validation of S-allyl-L-cysteine in rat plasma using a mixed-mode reversed-phase and cation-exchange LC-ESI-MS/MS method: application to pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. Sci.*, **53**, 54–59 (2015).
- 31) Bröer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.*, **88**, 249–286 (2008).
- 32) Silbernagl S, Foulkes EC, Deetjen P. Renal transport of amino acids. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **74**, 105–167 (1975).
- 33) Lash LH and Anders MW. Uptake of nephrotoxic S-conjugates by isolated rat renal proximal tubular cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**, 531–537 (1989).
- 34) Pombrio JM, Giangreco A, Li L, Wempe MF, Anders MW, Sweet DH, Pritchard JB, Ballatori N. Mercapturic acids (N-acetylcysteine S-conjugates) as endogenous substrates for the renal organic anion transporter-1. *Mol. Pharmacol.*, **60**, 1091–1099 (2001).
- 35) Zalups RK and Ahmad S. Transport of N-acetylcysteine s-conjugates of methylmercury in Madin-Darby canine kidney cells stably transfected with human isoform of organic anion transporter 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 1158–1168 (2005).
- 36) Heuner A, Dekant W, Schwegler JS, Silbernagl S. Localization and capacity of the last step of mercapturic acid biosynthesis and the reabsorption and acetylation of cysteine S-conjugates in the rat kidney. *Pflugers Arch.*, **417**, 523–527 (1991).
- 37) Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.*, **29**, 175–274 (1979).
- 38) Hinchman CA and Ballatori N. Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. *J. Toxicol. Environ. Health*, **41**, 387–409 (1994).
- 39) Lohr JW, Willsky GR, Acara MA. Renal Drug Metabolism. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 107–141 (1998).

- 40) Commandeur JN, Stijntjes GJ, Vermeulen NP. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.*, **47**, 271–330 (1995).
- 41) Duffel MW and Jakoby WB. Cysteine S-conjugate N-acetyltransferase from rat kidney microsomes. *Mol. Pharmacol.*, **21**, 444–448 (1982).
- 42) Green RM and Elce JS. Acetylation of S-substituted cysteines by a rat liver and kidney microsomal N-acetyltransferase. *Biochem. J.*, **147**, 283–289 (1975).
- 43) Okajima K, Inoue M, Morino Y, Itoh K. Topological aspects of microsomal N-acetyltransferase, an enzyme responsible for the acetylation of cysteine S-conjugates of xenobiotics. *Eur. J. Biochem.*, **142**, 281–286 (1984).
- 44) Tateishi M. Methylthiolated metabolites. *Drug Metab. Rev.*, **14**, 1207–1234 (1983).
- 45) Bray HG and James SP. The formation of mercapturic acids. 4. Deacetylation of mercapturic acids by the rabbit, rat and guinea pig. *Biochem. J.*, **74**, 394–397 (1960).
- 46) Suzuki S and Tateishi M. Purification and characterization of a rat liver enzyme catalyzing N-deacetylation of mercapturic acid conjugates. *Drug Metab. Dispos.*, **9**, 573–577 (1981).
- 47) Ripp SL, Itagaki K, Philpot RM, Elfarra AA. Species and sex differences in expression of flavin-containing monooxygenase form 3 in liver and kidney microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 46–52 (1999).
- 48) Krause RJ, Lash LH, Elfarra AA. Human kidney flavin-containing monooxygenases and their potential roles in cysteine s-conjugate metabolism and nephrotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**, 185–191 (2003).
- 49) Zheng Y, Xu J, Ma G, Zhang J, Zhu Q, Liu H, Zhang P, Zhu Y, Cai W. Bioavailability and pharmacokinetics of S-propargyl-L-cysteine, a novel cardioprotective agent, after single and multiple doses in Beagle dogs. *Xenobiotica*, **42**, 304–309 (2012).
- 50) Zheng Y, Liu H, Ma G, Yang P, Zhang L, Gu Y, Zhu Q, Shao T, Zhang P, Zhu Y, Cai W. Determination of S-propargyl-cysteine in rat plasma by mixed-mode reversed-phase and cation-exchange HPLC-MS/MS method and its application to pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**, 1187–1191 (2011).
- 51) Zheng YT, Zhu JH, Ma G, Zhu Q, Yang P, Tan B, Zhang JL, Shen HX, Xu JL, Zhu YZ, Cai WM. Preclinical assessment of the distribution, metabolism, and excretion of S-propargyl-cysteine, a novel H₂S donor, in Sprague-Dawley rats. *Acta Pharmacol. Sin.*, **33**, 839–44 (2012).

- 52) Hinchman CA, Rebbeor JF, Ballatori N. Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturic acid. *Am. J. Physiol.*, **275**, G612–G619 (1998).
- 53) Armstrong MD. N-delta-acetylornithine and S-methylcysteine in blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, **587**, 638–642 (1979).
- 54) Rubino FM, Pitton M, Di Fabio D, Meroni G, Santaniello E, Caneva E, Pappini M, Colombi A. Measurement of S-methylcysteine and S-methyl-mercaptopuric acid in human urine by alkyl-chloroformate extractive derivatization and isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **25**, 330–343 (2011).
- 55) Sausen PJ and Elfarra AA. Cysteine conjugate S-oxidase. Characterization of a novel enzymatic activity in rat hepatic and renal microsomes. *J. Biol. Chem.*, **15**, 6139–6145 (1990).
- 56) Madabushi R, Frank B, Drewelow B, Derendorf H, Butterweck V. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **62**, 225–233 (2006).
- 57) Uchida S, Yamada H, Li XD, Maruyama S, Ohmori Y, Oki T, Watanabe H, Umegaki K, Ohashi K, Yamada S. Effects of Ginkgo biloba extract on pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolbutamide and midazolam in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 1290–1298 (2006).
- 58) Izzo AA and Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: an updated systematic review. *Drugs*, **69**, 1777–1798 (2009).
- 59) Obach RS. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 88–95 (2000).
- 60) Ioannides C. Pharmacokinetic interactions between herbal remedies and medicinal drugs. *Xenobiotica*, **32**, 451–478 (2002).
- 61) Smith DA, Abel SM, Hyland R, Jones BC. Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica*, **28**, 1095–1128 (1998).
- 62) Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1201–1208 (2004).
- 63) Nelson DR. Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol. Biol.*, **320**, 1–10 (2006).
- 64) Guengerich, FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 70–83 (2008).
- 65) Zanger UM, Turpeinen M., Klein K. Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal. Bioanal. Chem.*, **392**, 1093–1108

(2008).

- 66) Lamb DC, Waterman MR, Kelly SL, Guengerich FP. Cytochromes P450 and drug discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 504–512 (2007).
- 67) Spatzenegger M and Jaeger W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.*, **27**, 397–417 (1995).
- 68) Markowitz JS, Devane CL, Chavin KD, Taylor RM, Ruan Y, Donovan JL. Effects of garlic (*Allium sativum* L.) supplementation on cytochrome P450 2D6 and 3A4 activity in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **74**, 170–177 (2003).
- 69) Gallicano K, Foster B, Choudhri S. Effect of short-term administration of garlic supplements on single-dose ritonavir pharmacokinetics in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **55**, 199–202 (2003).
- 70) Piscitelli SC, Burstein AH, Welden N, Gallicano KD, Falloon J. The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir. *Clin. Infect. Dis.*, **34**, 234–238 (2002).
- 71) Prueksaritanont T, Gorham LM, Ma B, Liu L, Yu X, Zhao JJ, Slaughter DE, Arison BH, Vyas KP. In vitro metabolism of simvastatin in humans: identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s. *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 1191–1199 (1997).
- 72) Guengerich FP, Brian WR, Iwasaki M, Sari MA, Bäärnhielm C, Berntsson P. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P-450 IIIA4. *J. Med. Chem.*, **34**, 1838–1844 (1991).
- 73) Crespi CL, Miller VP, Penman BW. Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal. Biochem.*, **248**, 188–190 (1997).
- 74) Stresser DM, Blanchard AP, Turner SD, Erve JC, Dandeneau AA, Miller VP, Crespi CL. Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates. *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 1440–1448 (2000).
- 75) Miller VP, Stresser DM, Blanchard AP, Turner S, Crespi CL. Fluorometric high-throughput screening for inhibitors of cytochrome P450. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **919**, 26–32 (2000).
- 76) Dierks EA, Stams KR, Lim HK, Cornelius G, Zhang H, Ball SE. A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 23–29 (2001).
- 77) Walsky RL and Obach RS. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab.*

Dispos., **32**, 647–660 (2004).

- 78) Ayrton J, Plumb R, Leavens WJ, Mallett D, Dickins M, Dear GJ. Application of a generic fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of cytochrome P450 probe substrates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 217–224 (1998).
- 79) Yin H, Racha J, Li SY, Olejnik N, Satoh H, Moore D. Automated high throughput human CYP isoform activity assay using SPE-LC/MS method: application in CYP inhibition evaluation. *Xenobiotica*, **30**, 141–154 (2000).
- 80) Cohen LH, Remley MJ, Raunig D, Vaz AD. In vitro drug interactions of cytochrome P450: an evaluation of fluorogenic to conventional substrates. *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 1005–1015 (2003).
- 81) Wang J, Urban L, Bojanic D. Maximising use of in vitro ADMET tools to predict in vivo bioavailability and safety. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **3**, 641–665 (2007).
- 82) Bell L, Bickford S, Nguyen PH, Wang J, He T, Zhang B, Friche Y, Zimmerlin A, Urban L, Bojanic D. Evaluation of fluorescence- and mass spectrometry-based CYP inhibition assays for use in drug discovery. *J. Biomol. Screen.*, **13**, 343–353 (2008).
- 83) Nomeir AA, Ruegg C, Shoemaker M, Favreau LV, Palamanda JR, Silber P, Lin CC. Inhibition of CYP3A4 in a rapid microtiter plate assay using recombinant enzyme and in human liver microsomes using conventional substrates. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 748–753 (2001).
- 84) Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Gaman EA, Houston JB, Tremaine LM. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316**, 336–348 (2006).
- 85) von Moltke LL, Greenblatt DJ, Schmider J, Wright CE, Harmatz JS, Shader RI. In vitro approaches to predicting drug interactions in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 113–122 (1998).
- 86) Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Obach RS, Greenblatt DJ. Drug metabolism and drug interactions: application and clinical value of in vitro models. *Curr. Drug Metab.*, **4**, 423–459 (2003).
- 87) Cer RZ, Mudunuri U, Stephens R, Lebeda FJ. IC₅₀-to-K_i: a web-based tool for converting IC₅₀ to K_i values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Res.*, **37**, W441–W445 (2009).
- 88) Lin T, Pan K, Mordenti J, Pan L. In vitro assessment of cytochrome P450 inhibition: strategies for increasing LC/MS-based assay throughput using a one-point IC(50) method and multiplexing high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.*, **96**, 2485–2493 (2007).
- 89) Yao M, Zhu M, Sinz MW, Zhang H, Humphreys WG, Rodrigues AD, Dai R. Development and full

- validation of six inhibition assays for five major cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes using an automated 96-well microplate incubation format and LC-MS/MS analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 211–223 (2007).
- 90) Zientek M, Miller H, Smith D, Dunklee MB, Heinle L, Thurston A, Lee C, Hyland R, Fahmi O, Burdette D. Development of an in vitro drug–drug interaction assay to simultaneously monitor five cytochrome P450 isoforms and performance assessment using drug library compounds. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **58**, 206–214 (2008).
 - 91) Perloff ES, Mason AK, Dehal SS, Blanchard AP, Morgan L, Ho T, Dandeneau A, Crocker RM, Chandler CM, Boily N, Crespi CL, Stresser DM. Validation of cytochrome P450 time-dependent inhibition assays: a two-time point IC₅₀ shift approach facilitates kinact assay design. *Xenobiotica*, **39**, 99–112 (2009).
 - 92) Liu KH, Kim MJ, Jeon BH, Shon JH, Cha IJ, Cho KH, Lee SS, Shin JG. Inhibition of human cytochrome P450 isoforms and NADPH-CYP reductase in vitro by 15 herbal medicines, including *Epimedii herba*. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **31**, 83–91 (2006).
 - 93) Unger M and Frank A. Simultaneous determination of the inhibitory potency of herbal extracts on the activity of six major cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography/mass spectrometry and automated online extraction. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 2273–2281 (2004).
 - 94) Foster BC, Vandenhoeck S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, Budzinski JW, Ramputh A, Arnason JT. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine*, **10**, 334–342 (2003).
 - 95) Ito K, Satoh T, Watanabe Y, Ikarashi N, Asano T, Morita T, Sugiyama K. Effects of Kampo medicines on CYP and P-gp activity in vitro. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 893–896 (2008).
 - 96) Zou L, Harkey MR, Henderson GL. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci.*, **71**, 1579–1589 (2002).
 - 97) Hutzler JM, Hauer MJ, Tracy TS. Dapsone activation of CYP2C9-mediated metabolism: evidence for activation of multiple substrates and a two-site model. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1029–1034 (2001).
 - 98) Ngui JS, Tang W, Stearns RA, Shou M, Miller RR, Zhang Y, Lin JH, Baillie TA. Cytochrome P450 3A4-mediated interaction of diclofenac and quinidine. *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 1043–1050 (2000).
 - 99) Liu KH, Kim MJ, Jung WM, Kang W, Cha IJ, Shin JG. Lansoprazole enantiomer activates human liver microsomal CYP2C9 catalytic activity in a stereospecific and substrate-specific manner. *Drug*

Metab. Dispos., **33**, 209–213 (2005).

- 100) Greenblatt DJ, Leigh-Pemberton RA, von Moltke LL. In vitro interactions of water-soluble garlic components with human cytochromes p450. *J. Nutr.*, **136**, 806S–809S (2006).
- 101) Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 1–17 (1999).
- 102) Wienkers LC and Heath TG Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 825–833 (2005).
- 103) Kenworthy KE, Bloomer JC, Clarke SE, Houston JB. CYP3A4 drug interactions: correlation of 10 in vitro probe substrates. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **48**, 716–727 (1999).
- 104) Wang RW, Newton DJ, Liu N, Atkins WM, Lu AY. Human cytochrome P-450 3A4: in vitro drug-drug interaction patterns are substrate-dependent. *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 360–366 (2000).
- 105) Kodera Y, Suzuki A, Imada O, Kasuga S, Sumioka I, Kanezawa A, Taru N, Fujikawa M, Nagae S, Masamoto K, Maeshige K, Ono K. Physical, chemical, and biological properties of s-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 622–632 (2002).
- 106) Foster BC, Foster MS, Vandenhoeck S, Krantis A, Budzinski JW, Arnason JT, Gallicano KD, Choudri S. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by galic. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **4**, 176–184 (2001).
- 107) Strandell J, Neil A, Carlin G. An approach to the in vitro evaluation of potential for cytochrome P450 enzyme inhibition from herbals and other natural remedies. *Phytomedicine*, **11**, 98–104 (2004).
- 108) Namyslo JC and Stanitzek C. A palladium-catalyzed synthesis of isoalliin, the main cysteine sulfoxide in onions (*Allium cepa*). *Synthesis*, **20**, 3367–3369 (2006).
- 109) Matsutomo T and Kodera Y. Development of an analytic method for sulfur compounds in aged garlic extract with the use of a postcolumn high performance liquid chromatography method with sulfur-specific detection. *J. Nutr.*, **146**, 450S–455S (2016).
- 110) Tabata K, Yamaoka K, Kaibara A, Suzuki S, Terakawa M, Hara T. Moment analysis program available on Microsoft Excel[®]. *Xenobio. Metab. Dispos.*, **14**, 286–293 (1999).
- 111) Obach RS. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 1350–1359 (1999).